Untersuchungen zur Funktion und Regulation von *Krüppel,* einem Segmentierungsgen von *Drosophila melanogaster (Meigen)*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Ulrike Gaul-Unnerstall,
geb. Gaul
aus Möckmühl

1988

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0029

Untersuchungen zur Funktion und Regulation von *Krüppel,* einem Segmentierungsgen von *Drosophila melanogaster (Meigen)*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Ulrike Gaul-Unnerstall,
geb. Gaul
aus Möckmühl

1988

Tag der mündlichen Prüfung:	18. 12. 1987
Dekan:	Prof. Dr. D. Varjú
1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. H. Jäckle
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Sperlich

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Priv. Doz. Dr. H. Jäckle am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie (Abteilung Prof. Dr. U. Schwarz) angefertigt.

Dr. C. Nüsslein-Volhard und ihren Mitarbeitern danke ich für die Zurverfügungstellung mutanter Fliegenstämme; Dr. D. Tautz und Dr. S. Carroll haben mir freundlicherweise Anti-*hb* Protein- bzw. Anti-*ftz* Protein-Antikörper zur Verfügung gestellt.

Für die Mithilfe bei Experimenten bedanke ich mich bei Dr. C. Dreyer (*in vitro* Test für "nuclear location signal" Sequenzen), Dr. Jäckle (Northern-blotanalyse), E.Seifert (Injektion von *Kr* RNA), Dr. R. Schuh und D. Weigel (*in situ* Hybridisierungsexperimente); insbesondere danke ich A. Kienlin, die mir bei einer Reihe von Antikörperfärbungen geholfen hat.
Abb. 9 der Arbeit ist in Zusammenarbeit mit Dr. R. Kemler (Friedrich-Miescher-Laboratorium) entstanden.

Dr. Jäckle, Dr. Nüsslein-Volhard, Dr. G. Jürgens und Dr. S. Cohen sowie den Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Dr. Jäckle und Dr. Nüsslein-Volhard möchte ich für anregende Gespräche danken.

D. Eder danke ich für die Anfertigung von Zeichnungen, R. Grömke-Lutz und ihren Mitarbeiterinnen für Photoarbeiten und J. Sauter für die Hilfe bei der Rasterelektronenmikroskopie.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen
Anlagenplan

I. Einleitung 1

II. Material und Methoden 7

1. DNA/RNA-Techniken 7
1.1 Herstellung von rekombinanter DNA zur Expression von Fusionsprotein 7
1.2 Herstellung von *Kr* mRNA zur Injektion in Embryonen und zur *invitro* Translation 9
1.3 Herstellung von RNA zur *insitu* Hybridisierung 10
1.4 Extraktion von RNA aus Embryonen, "Northernblots" 10
2. Protein-Techniken 10
2.1 Expression von Fusionsprotein 10
2.2 Reinigung von Fusionsprotein für die Immunisierung 11
2.3 Reinigung von Fusionsprotein für die Affinitätsreinigung der Antikörper 11
2.4 Kopplung von Peptiden an Trägerprotein (Antigenherstellung) 12
2.5 Herstellung von Affinitätssäulen zur Antikörperreinigung 13
2.6 Immunisierung der Versuchstiere; Herstellung von Seren 14
2.7 Affinitätsreinigung von Antikörpern 15
2.8 Kernextrakte aus Embryonen und Kulturzellen 15
2.9 *in vitro* Translation 15
2.10 Immunpräzipitation 16
2.11 "Westernblot" 17
2.12 Enzymgekoppelter Immuntest (ELISA) 17
2.13 Methoden zum funktionellen Nachweis eines "nuclear location signal" (NLS) 18
3. Fliegen, Embryonen, Histologie 19
3.1 Drosophilazucht 19
3.2 Mutanten und Stämme 20
3.2.1 Maternale Mutanten 21
3.2.2 Zygotische Mutanten (außer *Kr*) 22
3.2.3 Verwendete *Kr* Allele 23
3.3 Sammeln von Embryonen 24
3.4 Lebendbeobachtung von Embryonen 24
3.5 Kutikulapräparate 24
3.6 Injektion von RNA in junge Embryonen 25
3.7 Histologische Methoden 26
3.7.1 Rasterelektronenmikroskopie von Embryonen 26
3.7.2 Antikörperfärbung von "whole mount" Embryonen 26
3.7.3 *camera lucida* Auswertung von antikörpergefärbten "whole mount" Embryonen 29
3.7.4 Indirekte Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten von Embryonen 30

3.7.5 Indirekte Immunfluoreszenz auf Polytänchromosomen von Speicheldrüsen 30
3.7.6 Indirekte Immunfluoreszenz auf Schnitten von Hühnchenembryonen 31
3.7.7 *in situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten von Embryonen 31

III. Ergebnisse 36

1. Untersuchungen am *Kr* Protein 36
1.1 Herstellung der *Kr* Antikörper 36
1.2 Charakterisierung der *Kr* Antikörper 38
1.3 Intrazelluläre Lokalisation des *Kr* Proteins 42
1.4 Identifikation des "nuclear location signal" im *Kr* Protein 44
1.5 Untersuchungen zum "finger link" des *Kr* Proteins 48
1.5.1 "finger link" Antigene in *Drosophila* 50
1.5.2 "finger link" Antigene in anderen Spezies 52
2. Die *Kr* Proteindomäne im Blastoderm normaler und mutanter Embryonen 53
2.1 Die Position von *Kr* in der Hierarchie der Segmentierungsgene 54
2.2 Die *Kr* Proteindomäne in Gap Genmutanten 56
2.3 Die *Kr* Proteindomäne in maternalen Segmentierungsmutanten 59
2.3.1 Die *Kr* Proteindomäne in Mutanten posteriorer Organisatorgene 59
2.3.2 Die *Kr* Proteindomäne in Mutanten anteriorer Organisatorgene 62
2.3.3 Die *Kr* Proteindomäne in Mutanten terminaler Organisatorgene 65
2.3.4 Die *Kr* Proteindomäne in *osk bcd* Embryonen 66
2.4 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb*, und *ftz* in Mutanten anteriorer, posteriorer und terminaler Organisatorgene 66
2.4.1 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb*, und *ftz* in Mutanten der anterioren und posterioren Organisatorgene 68
2.4.2 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb*, und *ftz* in Mutanten der terminalen Organisatorgene 72
2.5 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb*, und *ftz* in *exu* Embryonen und in doppelmutanten Kombinationen mit *exu* 77
2.5.1 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb*, und *ftz* in *exu* Embryonen 78
2.5.2 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb*, und *ftz* in *tor exu* Embryonen 81
2.5.3 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb*, und *ftz* in *stau exu* Embryonen 82
2.6 Die *Kr* Proteindomäne in *BicD exu* Embryonen 84
3. Die *Kr* Proteinexpression nach dem Blastoderm 87
3.1 Beschreibung des Musters der *Kr* Proteinexpression im Wildtyp 87
3.2 Späte phänotypische Defekte in *Kr* Mutanten 94
3.3 Regulation der *Kr* Proteinexpression nach dem Blastodermstadium 98
3.4 Vergleich von *Kr* Transkript- und Proteinmuster im Wildtypembryo 106
3.5 Analyse der *Kr* Proteinexpression in verschiedenen *Kr* Allelen 110

IV. Diskussion 116

1. Zu den Untersuchungen am *Kr* Protein 116
2. Die *Kr* Proteinexpression im Blastoderm 119
3. Die *Kr* Proteinexpression nach dem Blastoderm 133

Zusammenfassung 138
Literaturverzeichnis 140
Lebenslauf 151

Abkürzungen

a	anterior
A	abdominales Segment
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Gnathalsegment
cDNA	complementary DNA
d	Tag(e)
DAPI	4´, 6-Diamidino-2-Phenylindol
dH_2O	destilliertes Wasser
ddH_2O	doppeltdestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EL	Eilänge
ELISA	enzymgekoppelter Immuntest
EMS	Ethylmethansulfonat
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
h	Stunde(n)
Hepes	Hydroxyethylpiperazin-2-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin, Subklasse G
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton
LB Medium	Luria Broth Medium
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
NLS	nuclear location signal
NP40	Nonidet P40
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
p	posterior
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
PS	Parasegment
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Staph A	Staphylococcus aureus
T	thorakales Segment

UNIV. LAMSW BIBL.

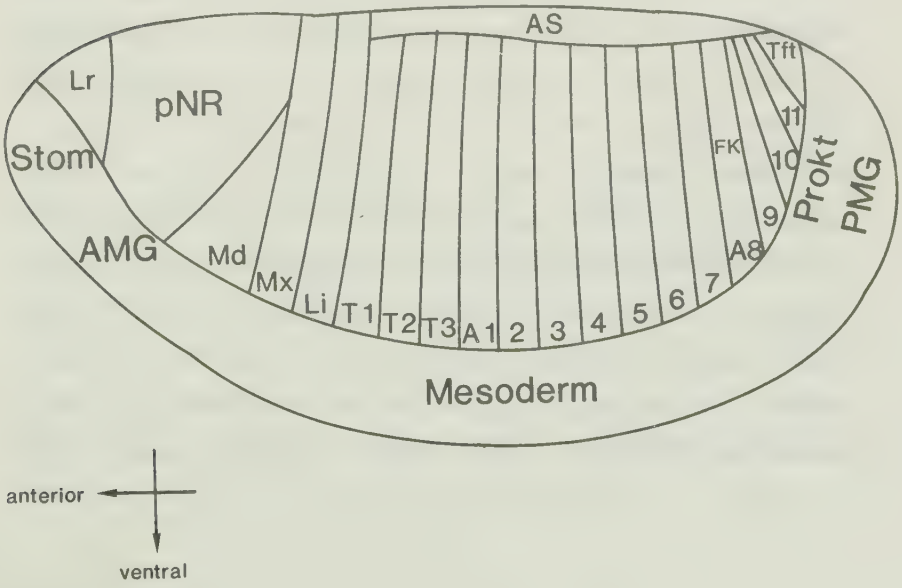
tRNA	transfer RNA
Tris	Tris (Hydroxylmethyl)Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Anlagenplan des *Drosophila*embryos

In dem hier dargestellten vereinfachten Anlagenplan sind die Anlagen der für diese Arbeit wesentlichen Strukturen der antero-posterioren wie der dorso-ventralen Achse eingetragen.
Anlagenpläne sind auf verschiedene Weise erstellt worden, so durch Defektsetzung von Zellen im Blastoderm durch Entnahme von Zellen oder UV-Laser Bestrahlung und Analyse der Defekte im Keimstreifstadium oder im Kutikulamuster der Larve (Underwood et al., 1980; Lohs-Schardin et al., 1979) oder durch Markierung von Blastodermzellen mit Meerettich-Peroxidase und Verfolgung des weiteren Schicksals dieser Zellen im Verlauf der Entwicklung (Technau und Campos-Ortega, 1985).

Als Telson wird in dieser Arbeit die Region hinter dem 8. Abdominalsegment bezeichnet: sie erscheint im ausdifferenzierten Embryo als nicht segmentiert.

AMG	vorderer Mitteldarm	Mx	Maxille
AS	Amnioserosa	PMG	hinterer Mitteldarm
Fk	Filzkörper	pNR	procephale neurogene
Li	Labium		Region
Lr	Labrum	Prokt	Proktodäum
Md	Mandibel	Stom	Stomodäum
		Tft	Tuft



I. Einleitung

Entwicklungsgenetische Methoden haben es ermöglicht, den komplexen Prozeß der Segmentierung des *Drosophila*embryos in einzelne Schritte zu zerlegen und die genetischen Komponenten, die für die Etablierung des Segmentmusters verantwortlich sind, zu identifizieren (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980; Nüsslein-Volhard et al., 1982; Übersichtsartikel: Akam, 1987). Zunächst sind zwei Typen von Genen zu unterscheiden: maternale Gene, die während der Oogenese, und zygotische Gene, die nach der Fertilisation, genauer mit Beginn des Blastodermstadiums, exprimiert werden (Nüsslein-Volhard et al., 1982). Die Analyse der mutanten Phänotypen legt die Interpretation nahe, daß maternale Gene für die erste, grundlegende Strukturierung der antero-posterioren Achse des Embryos sorgen, während den zygotischen Genen die regionale bzw. lokale Organisation des Segmentmusters zufällt (Nüsslein-Volhard et al., 1982).

Innerhalb der Gruppe der zygotischen Segmentierungsgene kann nach Maßgabe der Art der Störung des Segmentmusters eine Typologisierung in folgende Klassen vorgenommen werden: "Gap"-, Paarregel- und Segmentpolaritätsgene (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1982). Diese Klassen bilden zudem eine Hierarchie, die als für die Organisierung des Segmentmusters funktional angesehen wird: Die embryonale Anlage wird sukzessive in immer kleinere Einheiten zerlegt. Zunächst sorgen die "Gap" Gene für eine grobe Unterteilung der Longitudinalachse in jeweils zusammenhängende Regionen, die Paarregelgene definieren daraufhin Einheiten von Doppelsegmentgröße und die Segmentpolaritätsgene kontrollieren schließlich das Muster in jedem einzelnen Segment. Über

die repetitive Unterteilung in metamere Einheiten hinaus wird deren Qualität durch die Gruppe der homöotischen Gene festgelegt.

Viele der homöotischen, Paarregel- und Segmentpolaritätsgene wurden inzwischen kloniert (Übersichtsartikel: Scott und O´Farrell, 1986; Akam, 1987); das raum-zeitliche Muster ihrer Expression konnte durch *in situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten von Embryonen sichtbar gemacht werden. Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß sich bereits am Ende des Blastoderms ein regionsspezifisches Muster der Genexpression etabliert hat, das in Position und - gegebenfalls- Periodizität mit den phänotypischen Ausfallregionen der entsprechenden Mutanten korreliert (Übersichtsartikel: Scott und O´Farrell, 1986; Akam, 1987). Diese Befunde bekräftigen die Ergebnisse von Transplantationsversuchen, die ein Mosaik-verhalten der Zellen im späten Blastoderm gezeigt haben (Simcox und Sang, 1983; Chan und Gehring 1971). Hybridisierungen an mutanten Em-bryonen bestätigen die angenommene hierarchische Ordnung innerhalb der Gruppe der Segmentierungsgene ("Gap" Gene -- Paarregelgene -- Segmentpolaritätsgene) (Ingham et al. 1986; Howard und Ingham 1986; u.a.).

Während nun die Rolle der Paarregel- und Segmentpolaritätsgene im Segmentierungsprozeß intuitiv klar erscheint, ist die Funktion der "Gap" Gene weniger durchsichtig. Man wird ihnen aufgrund ihrer Stellung in der hypothetischen Genhierarchie eine Vermittlerrolle zwischen maternalen und Paarregelgenen zuweisen. Dem von Meinhardt (1986) entwickelten Modell der Segmentierung zufolge geht diese Vermittlung in folgender Weise vor sich: Maternale Faktoren bilden einen morphogenetischen Gradienten, der sich, ausgehend von einem Maximum am posterioren

Ende, über das ganze Ei hinweg erstreckt. In den verschiedenen Konzentrationsbereichen des Gradienten wird je präferentiell eines der Gap Gene angeschaltet. Indem sie ihre eigene Expression positiv und die des benachbarten Gap Gens negativ regulieren, etablieren die Gap Gene daraufhin gegeneinander abgegrenzte Domänen ihrer Expression. Durch Kooperation an ihrer Grenze instruieren je zwei Gap Gene dann gemeinsam die Expression eines Paarregelgenes und etablieren so ein festes Raster für das System der Paarregelgene. Die Gap Gene würden also nach diesem Modell eine Transformation der gradiiert vorliegenden maternalen Positionsinformation in die periodische der Paarregelgene leisten.

Die primäre Absicht vorliegender Arbeit ist eine Weiterführung der Analyse von Regulation und Funktion des Gap Gens *Krüppel* im Rahmen der hier entwickelten Vorstellungen; daher seien zunächst die bislang bekannten genetischen und molekularen Eigenschaften dieses Gens zusammengestellt.

Krüppel (*Kr*) wurde ursprünglich aufgrund seines dominanten adulten Phänotyps isoliert (Gloor, 1954). Heterozygote Fliegen zeigen in geringer Frequenz Defekte im Thorax, die sich im Ausfall eines mesothorakalen Beins oder eines Flügels bzw. in Duplikation von Bein- oder Flügelstrukturen äußern.
Homozygote *Kr* Embryonen sterben vor dem Schlüpfen und zeigen einen "Gap" Phänotyp, der durch den Ausfall eines zusammenhängenden Bereichs von Segmenten charakterisiert ist. In amorphen Allelen sind die drei Thorakal- und die ersten fünf der insgesamt acht Abdominalsegmente deletiert und durch eine spiegelbildliche Duplikation des 6.

Abdominalsegments ersetzt. Die weiteren identifizierten Allele am *Kr* Locus können zu einer allelischen Serie geordnet werden (Preiss, 1985). An der Ausprägung des *Kr* Phänotyps ist keine maternale Komponente beteiligt. Aus dem Überleben homozygoter *Kr* Zellen nach dem Blastoderm kann geschlossen werden, daß das *Kr* Gen zur Aufrechterhaltung normaler Zellfunktionen nicht benötigt wird. Da sich Kr^- Embryonen bereits zu Beginn der Gastrulation von normalen Embryonen unterscheiden, läßt sich für *Kr* das Blastoderm als phänokritische Periode angeben (Wieschaus et al., 1984).

Auf elegante Weise konnte das *Kr* Gen kloniert und identifiziert werden (Preiss et al., 1985): *Kr* wurde zytologisch in der Chromosomenbande 60F3, an der Spitze des zweiten Chromosoms, kartiert. DNA aus dieser Bande wurde mikrokloniert und mit ihr ein "chromosomal walk" initiiert, mit dem die gesamte *Kr*-Region abgedeckt wurde. Die biologisch aktiven Sequenzen innerhalb der *Kr*-Region konnten durch Injektion geno-mischer DNA Fragmente aus dem "chromosomal walk" in Kr^- Embryonen identifiziert werden. Eines der DNA Fragmente bewirkte eine Abschwächung des extremen Phänotyps der injizierten *Kr* Embryonen, d.h. es entwickelte eine schwache Kr^+-Aktivität, die mit der *Kr* Restaktivität in schwachen Allelen vergleichbar ist. In einem dazu komplementären Versuchsansatz gelang die Identifikation der transkribierten *Kr* Sequenzen. Durch Injektion synthetischer Sequenzen, die zur vermuteten *Kr* mRNA komplementär sind (*Kr* anti-sense RNA), wurde in Wildtypembryonen die Dosis von Kr^+-Aktivität gesenkt, mit der Folge, daß Wildtypembryonen sich zu schwachen und intermediären Phänokopien von *Kr* Allelen entwickelten (Rosenberg et al., 1985).

Das raum-zeitliche Muster der *Kr* Genexpression wurde durch *in situ* Hybridisierung von "*Kr* anti-sense RNA" an Gewebeschnitte von Embryonen untersucht (Knipple et al., 1985). Erste *Kr* Transkripte sind im synzytialen Blastoderm nachweisbar. Während der Zellularisation wird eine Domäne der Expression sichtbar, die in der Mitte des Embryos lokalisiert ist. Daß *Kr* zu diesem frühen Zeitpunkt exprimiert wird, steht in Einklang mit den Beobachtungen, die das Blastoderm als phäno-kritische Periode für *Kr* ausweisen (s.o.), und mit der Annahme, daß *Kr* durch maternale Genprodukte aktiviert wird. Die *Kr* Genexpression bleibt nun interessanterweise nicht auf diese erste zentrale Domäne beschränkt. Am Ende des Blastodermstadiums entwickelt sich am posterioren Pol eine Domäne der Expression, und wenig später, zu Beginn der Gastrulation, eine weitere am Vorderpol. Die weitere Entwicklung erlaubt eine Zuordnung dieser Expressionsdomäne zum stomatogastrischen Nervensystem (vordere *Kr* Domäne) und zu den Malpighianlagen (hintere *Kr* Domäne). Im ausgestreckten Keimstreif werden *Kr* Transkripte im Mesoderm, einschließlich des Nervengewebes, akkumuliert. Diese Ergebnisse legen nahe, daß *Kr* nicht nur an der Segmentierung beteiligt ist, sondern möglicherweise auch in späteren Entwicklungsprozessen eine Rolle spielt.

Die Sequenzanalyse des *Kr* Gens (Rosenberg et al. 1986) zeigte, daß im *Kr* Gen nur ein großes offenes Leseraster existiert (1398 bp). Die aus diesem offenen Leseraster abgeleitete Aminosäuresequenz besitzt eine strukturelle Homologie zu den Aminosäuresequenzen von TF IIIA (Transkriptionsfaktor von Xenopus) und ADR 1 (Transkriptionsaktivator der Alkoholdehydrogenase in Hefe), und zwar jeweils mit der DNA-bindenden Domäne dieser Proteine.

Somit legt sich insgesamt die Vorstellung nahe, daß das *Kr* Protein als "trans-acting factor" an Kontrollsequenzen von Genen bindet, die in der Segmentierungsgenhierarchie *Kr* gegenüber nachgeschaltet sind, und so deren Transkription reguliert.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Antikörper gegen das *Kr* Protein herzustellen und mit ihrer Hilfe näheren Aufschluß über die Regulation und die Funktion von *Kr* zu gewinnen. Zunächst ermöglichten die Antikörper einige Untersuchungen am *Kr* Protein selbst (III.1). Der Schwerpunkt der Arbeit lag dann auf der Analyse der Regulation der *Kr* Expression im Blastoderm durch maternale Gene; die Betrachtung verschiedener Entwicklungsmutanten lieferte dabei zugleich Hinweise auf die Funktionsweise von *Kr* bzw. der Gap Gene im Segmentierungs-prozeß (III.2). Schließlich wurde die Expression von *Kr* in späteren Stadien der Embryogenese analysiert (III.3).

II. Material und Methoden

1. DNA/RNA-Techniken

1.1 Herstellung von rekombinanter DNA zur Expression von Fusionsprotein

Um Antikörper gegen Genprodukte, deren cDNA verfügbar ist, herzustellen, fusioniert man cDNA mit Vektoren, die eine Expression des Proteins in Bakterien erlauben. Die cDNA wird dabei in der Regel 3´ an die kodierende Sequenz eines bakteriellen Proteins (z.B. ß-Galaktosidase) fusioniert, so daß ein Hybridprotein produziert wird. Immunisiert man mit einem solchen Fusionsprotein, erhält man natürlich auch und insbesondere Antikörper gegen das bakterielle Protein. Da die Entfernung dieser kontaminierenden Aktivität aus dem Serum sehr mühsam sein kann, wurde folgende Strategie eingeschlagen: Es wurden zwei verschiedene Expressionssysteme verwendet; beide produzierten das gleiche *Kr* Protein, doch war es jeweils mit verschiedenen bakteriellen Proteinen fusioniert: pUR Vektoren (s. folgende Seite) wurden für die Produktion von *Kr*-ß-Galaktosidase Fusionsprotein und pATH Vektoren (s. folgende Seite) für die Produktion von *Kr*-trpE Fusionsprotein verwendet. Ersteres Fusionsprotein wurde zur Immunisierung, letzteres für die Affinitätsreinigung des Serums benutzt. Da keine Kreuzreaktivität zwischen ß-Galaktosidase und trpE-Protein besteht, sind Antikörper gegen den bakteriellen Anteil des Fusionsproteins leicht zu entfernen.

a. Beschreibung der Vektoren

Das pUR System (genaue Beschreibung s. Rüther, 1983), besteht aus drei Vektoren (pUR 278, 288 und 289), mit folgenden Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung verwendet werden können: Bam HI, Sal I, Xba I, Hind III. Die Verwendung der drei Vektoren erlaubt die Verlängerung des offenen Leserasters am 3´ Ende des lacZ Gens (MG des ß-Galaktosidaseanteils 116 kD) in allen drei Leserastern. Das pATH System (bislang noch unveröffentlicht; T. Körner, N.Y.) besitzt folgende Schnittstellen: Sma I, Sac I, Eco RI, Bam HI, Xba I, Sal I, Pst I, Hind III und Cla I, und zwar am 3´ Ende der kodierenden Sequenz des bakteriellen trpE Gens (MG des trpE Produkts 37 kD). Beide Expressionssysteme erlauben die Selektion über Ampicillinresistenz.

b. Herstellung der *Kr* Konstrukte

Die im folgenden verwendeten DNA-Techniken sind in Maniatis (1983) und Preiss (1985) beschrieben.
Kr-spezifische Sequenzen wurden aus dem cDNA Klon pcK 2b entnommen (Rosenberg et al., 1986). Das 2059 bp lange Xba I Fragment des pcK 2b Klons, das beinahe die gesamte kodogene Region von *Kr* enthält, wurde in die Xba I Schnittstellen von pUR 278 und pATH 10 kloniert. Um das 2,1 kb lange Xba I Fragment des pcK 2b Klons zu reinigen, wurde pcK 2b DNA mit der Restriktionsendonuklease Xba I verdaut, die verdaute DNA im Agarosegel aufgetrennt und die 2.1 kb Bande isoliert. Vektor DNA wurde mit Xba I verdaut und anschließend mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu unterdrücken. Die so vorbehandelte Vektor DNA wurde dann mit dem 2,1 kb Xba I Fragment

des pcK 2b Klons ligiert; es wurden - bezogen auf "sticky ends"- äquimolare Mengen eingesetzt. Mit der ligierten DNA wurden kompetente Zellen des Wirtsstamms JM 83 transformiert. Transformante Kolonien wurden auf Insertion von *Kr* Gensequenzen getestet. Dazu wurden einzelne Kolonien auf Nitrozellulosefiltern ausgestrichen (Duplikate davon auf Agarplatten) und ÜN auf Agarplatte kultiviert. Nach Denaturierung der DNA wurden die Nitrozellulosefilter bei 80° C im Vakuumofen gebacken und anschließend mit radioaktiv markierter *Kr* DNA (Bam HI/Sal I Fragment als molekulare Probe) hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Filter unter stringenten Bedingungen gewaschen (Chow und Broker, 1981), luftgetrocknet, in Folie eingeschweißt und zusammen mit Fuji Röntgenfilmen zur Exposition gelagert. Von positiven Klonen wurde DNA präpariert; durch Restriktionsanalyse wurde die Orientierung des *Kr* cDNA Fragments bestimmt. Klone, die die richtige Orientierung aufwiesen, wurden auf die Expression von Fusionsprotein getestet.

1.2 Herstellung von *Kr* mRNA zur Injektion in Embryonen und zur *in vitro* Translation

Kr mRNA wurde durch *in vitro* Transkription des klonierten SP6-*Kr*-Konstrukts (s. Abb. 1 b) nach Angaben des Enzymherstellers (Firma Promega Biotec (Riboprobe™ System) hergestellt. Anstelle von radioaktivem Nucleotid wurde dem Versuchsansatz methyliertes ^{m}GpppG

(0.5 mM) zugesetzt, um durch "capping" die RNA vor schneller Degradation im Embryo zu schützen (Melton et al., 1984).

1.3 Herstellung von RNA zur *in situ* Hybridisierung

RNA zur *in situ* Hybridisierung wurde wie in Knipple et al. (1985) beschrieben hergestellt.

1.4 Extraktion von RNA aus Embryonen, "Northernblots"

Die Extraktion von RNA aus Embryonen wurde nach dem Protokoll von Steller und Pirrotta (1984) durchgeführt; die "Northernblot"-Analyse erfolgte nach Thomas (1980).

2. Protein-Techniken

2.1 Expression von Fusionsproteinen

Um die kodierende Regionen der Fusionsproteine zur Expression zu bringen, wurden geeignete Wirtsstämme mit den rekombinanten Plasmiden (s.1.1) transformiert. Für pUR Konstrukte diente "71-18" als Wirtsstamm. Transformante Bakterien wurden in LB Medium (mit 50 ug/ml Ampicillin) angezogen und bei einer OD_{600} von 0.4 mit 1 mM IPTG für 2 h induziert. Für pATH Konstrukte wurde "C 600" als Wirtsstamm verwendet. Transformante Bakterien wurden in M 9 Medium (Maniatis et al., 1982), das mit 5 g/l Casaminosäuren (vitaminfrei; Difco) supplementiert wurde, angezogen und bei einer OD_{600} von 0.4 mit 5 ug/ml Indolylacrylsäure (Stammlösung 5 mg/l in abs. Ethanol) 4 h induziert. Nach der Induktion

wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5 000 Upm; GSA Sorvall) und das Sediment bei -70 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.2 Reinigung von Fusionsprotein für die Immunisierung

Um Antigen für die Immunisierung zu reinigen, wurde das Zellsediment (s. 2.1) in Laemmli "sample buffer" resuspendiert (500 ml Zellsuspension in 2-5 ml "sample buffer") (Vestweber, 1985) und 5´ bei der Leistung sonifiziert, die ohne Schäumen der Lösung maximal erreicht werden kann. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 15 000 g (5´) entfernt. Der so erhaltene Überstand wird dann auf einem 8 %igen präparativen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Vestweber, 1985). Das Proteingel wird gemäß einer Standardprozedur (Vestweber, 1985) mit Coomassieblue angefärbt; die fragliche Bande, die zuvor durch "Westernblotting" identifiziert worden war, wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

2.3 Reinigung von Fusionsprotein für die Affinitätsreinigung des Antikörpers (nach Rio, 1986)

Für die Affinitätsreinigung wurde das Fusionsprotein auf folgende Weise isoliert: Das Zellsediment (s. 2.1) von 1000 ml induzierten Bakterien wurde auf Eis in 5 ml Puffer A (50 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 mM Benzamidin) aufgetaut; der Suspension wurde festes Lysozym zugesetzt (Endkonzentration 0.2 mg/ml; 20´ auf Eis), danach Triton X-100 (Endkonzentration 1%, 10´ auf Eis) und Zwittergent (Sigma) (Endkonzentration 1%, 10´ auf Eis). Anschließend wurde die Suspension 3x 60´´ sonifiziert, bis die Viskosität der Lösung

abgenommen hatte, und auf ein Saccharosekissen (15 ml 40% Saccharose in 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 0.2 M NaCl) geschichtet. Während der nachfolgenden Zentrifugation (30´ bei 12 000 g; HB4 Sorvall) verblieben gelöste Anteile oberhalb der Saccharoseschicht, während das Fusionsprotein als "Aggregat" präzipitierte. Das so erhaltene Sediment wurde in 0.5 ml PBS resuspendiert und mit 5 ml Extraktionspuffer extrahiert (8 M Harnstoff, 0.5 M NaCl, 0.5 M Tris pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 mM Benzamidin). Zur Extraktion wurde die Suspension 15´ bei Raumtemperatur belassen und dabei mehrere Male "gevortext". Anschließend wurde die Suspension mehrfach dialysiert, um den Harnstoff zu entfernen:

2x 1 h RT gegen 50 mM Tris pH 8, 0.5 M NaCl

ÜN 4 °C gegen 0.1 M Hepes pH 7.5 , 0.5 M NaCl.

Präzipitiertes Material wurde durch Zentrifugation (10´, 10 000 g, 0 °C) entfernt. Der Überstand wurde an das Säulenmaterial "affigel 10/15" (s. 2.6) gekoppelt.

2.4 Kopplung von Peptiden an Trägerprotein (Antigenherstellung)

Es wurden kommerziell hergestellte (NOVABIOCHEM; Schweiz) synthetische Peptide verwendet . Für eine Immunisierung kommen nur Peptide von einer Minimallänge von 10 Aminosäuren in Frage. Die Immunogenität der Peptide ist höher, wenn sie an ein Trägerprotein mit kleinem Molekulargewicht gekoppelt werden (Palfreyman et al., 1984).
Das "finger link"-Peptid (Thr Gly Glu Lys Pro Phe Glu Cys Pro Glu Cys Asp) wurde für die Immunisierung an Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelt und für die Affinitätsreinigung an Ovalbumin.

Zu einer 10 mg/ml konzentrierten Lösung von BSA in PBS wurde das ebenfalls in PBS gelöste Peptid in 50 molarem Überschuß gegenüber dem Trägerprotein zugegeben. Zu dieser Lösung wurde EDC (= 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid), gelöst in Wasser, in 5 molarem Überschuß gegenüber dem Peptid zugegeben, und die Reaktionslösung ÜN bei Raumtemperatur gerührt. Es schloß sich eine gründliche Dialyse gegen PBS bei 4 ^{o}C an (4 Wechsel). Die Kopplungseffizienz konnte auf einem SDS-Polyacrylamidgel (10%) sichtbar gemacht werden. (Briand, 1985; Shapira, 1984).

2.5 Herstellung von Affinitätssäulen zur Antikörperreinigung

Das Säulenmaterial für die Affinitätsreinigung von Antikörpern wurde auf folgende Weise hergestellt: Gereinigtes Fusionsprotein (s. 2.3) bzw. an Ovalbumin gekoppeltes "finger link"-Peptid (s. 2.4) wurde gemäß den Vorschriften des Herstellers (Biorad) an ein Gemisch von Affigel 10 und 15 (Verhältnis 3:1) gekoppelt; für die Säulenkopplung wurden jeweils ungefähr 1 mg Protein eingesetzt (Säulenvolumen 1-10 ml). Anschließend wurde das Säulenmaterial mit einem Hochsalzpuffer (0.1 M Hepes pH 7.5, 1 M NaCl) gewaschen, um nicht gekoppeltes Protein zu entfernen, und in PBS äquilibriert.

2.6 Immunisierung der Versuchstiere (Kaninchen); Herstellung der Seren (nach H. Schwarz, pers. Mitteilung)

Zur Immunisierung der Versuchstiere (Kaninchen) wurde eine Emulsion des jeweiligen Antigens mit Freund´s Adjuvans verwendet. Für die Immunisierung mit Peptid wurden 0.5-1 mg Protein pro Injektion verwendet (60% Adjuvans :40% Peptid in PBS gelöst). Fusionsprotein wurde im Polyacrylamidgel belassen und als Suspension (Proteinmenge im Gel ungefähr100-500 ug) injiziert. Pro Immunisierung wurde maximal 1 ml Emulsion verabreicht.

Folgendes Immunisierungsprotokoll wurde verwendet:

Tag 1: Grundimmunisierung mit "complete Freund´s adjuvant",

Tag 28: "Boosterimmunisierung" mit "incomplete Freund´s adjuvant"

Tag 36: erste Blutung; danach alternierend ein- und zweimal pro Woche.

Die Injektionen wurden subkutan in Lymphknotennähe und intramuskulär in Vorder- und Hinterläufe an multiplen Stellen vor-genommen. Die Kaninchen wurden aus der Ohrvene geblutet. Zur Herstellung von Serum wurde das Blut 1 h bei RT belassen und ÜN auf Eis gehalten; das geronnene Blut wurde 15´ bei 10 000 Upm (HB4 Sorvall) zentrifugiert, das Serum vorsichtig abgenommen und bei -20 ^{o}C gelagert. Der Antikörpertiter der Seren wurde im Falle der Peptidantikörper im emzymgekoppelten Immuntest (ELISA, s. 2.12), im Falle der *Kr* Fusionsproteinantikörper auf "Westernblots" (s. 2.11) bestimmt.

2.7 Affinitätsreinigung von Antikörpern

5 ml Serum (1:1 mit PBS verdünnt) wurden auf die Affinitätssäule (Herstellung s. 2.5) geladen, die dann mit BBS-Tween (0.1 M Borsäure, 25 mM Natriumtetraborat, 1M NaCl, 0.1 % Tween 20) solange gewaschen wurde, bis im Eluat kein Protein mehr nachweisbar war (OD_{280}). Die Elution erfolgte mit 0.1 M Glycin pH 2.8. Das Eluat wurde sofort mit 1 M Tris pH 8 neutralisiert. Die kombinierten Fraktionen wurden gegen 50 mM Tris pH 7.5/ PBS dialysiert und mit 0.1 % BSA zur Stabilisierung versetzt. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank wurde der Lösung zusätzlich 0.01 % Azid zugefügt.

2.8 Kernextrakte aus Embryonen und Kulturzellen.

Kernextrakte aus Drosophilaembryonen wurden von C. Schröder, Kernextrakte aus PCC4 Zellen (embryonale Mauskarzinomzellen) von Dr. H. Jäckle zur Verfügung gestellt.

2.9 *In vitro* Translation

In vitro Translationen wurden mit fertigen "Kits" von BRL nach Vorschrift angesetzt. Für 5 Translationsansätze: 15 ul Reaktions-Mix, 6,5 ul Kaliumacetat, 50 ul Retikulozytenlysat, 20 ul ^{35}S-Methionin (200 uCi), 8,5 ul ddH_2O.

Kr RNA (100-200 ng pro Ansatz) wurde in 10 ul H_2O mit 20 ul der oben beschriebenen Mischung 1 h bei 30 °C inkubiert.

2.10 Immunpräzipitation

Antikörper-Antigen-Komplexe wurden mit *Staphylococcus aureus* (Staph A), die nach der Vorschrift von Kessler aufgearbeitet und mit Formalin fixiert wurden, präzipitiert (genaue Beschreibung der Aufarbeitung s. Vestweber, 1985).

Immunpräzipitation mit *in vitro* translatierten Proteinen mußte wegen der hohen unspezifischen Wechselwirkung mit dem Immunadsorbent unter "hoch stringenten" Bedingungen, d.h. mit hoher Detergenzkonzentration, durchgeführt werden (Dobberstein, 1979).

Der Ansatz der *in vitro* Translation wurde auf 2 mM PMSF eingestellt und auf 500 ul Volumen aufgefüllt (1 % Nonidet P40, 150 mM NaCl, 2 mM PMSF, 10 mM Tris pH 7.6). Vorpräzipitiert wurde mit 10 ul Staph A und 5 ul eines Präimmunserums. Nach 30´ Inkubation wurde der Überstand aufgeteilt und mit je 10 ug *Kr* Antikörper und 10 ug Kaninchen-IgG als Kontrolle für 1 h bei 4 ^{o}C inkubiert. Das Staph A Sediment wurde anschließend dreimal mit 1% NP40, 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,6 und zweimal mit Waschpuffer (50 mM Tris pH 8.5, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05 % NP40, 1 mg/ml Ovalbumin) gewaschen. Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch 5´ Kochen mit "sample buffer" in Lösung gebracht. Die Proben wurden auf einem 10 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Gel 15´ mit ENLIGHTNING^{R} inkubiert, getrocknet und mit einem Kodak XR-5 Röntgenfilm exponiert.

2.11 "Westernblot"

Die Proteine wurden elektrophoretisch bei 0.5 A in Elektrophoresepuffer ohne SDS (Laemmli, 1970) auf Nitrocellulose (Schleicher & Schuell) übertragen. Die freie Bindungskapazität der Nitrocellulose wurde durch 1 h Inkubation mit 5% Magermilchpulver (Milupa) in PBS oder 1% Tween 20 abgesättigt, dann wurde mind. 2 h bei RT oder ÜN bei 4° C mit Primärantikörper inkubiert (in 5% Magermilchpulver, 0.1 % Tween 20, PBS). Danach wurde 3x 15´ gewaschen und 2 h mit enzymmarkiertem Sekundärantikörper inkubiert (Alkalische Phosphatase bzw. Peroxidase (Fab´)$_2$ Ziege-anti-Hase IgG (H+L) Dianova; 1:5000 im Waschlösung). Es wurde dreimal mit PBS/0.1 % Tween 20 gewaschen und anschließend angefärbt:

Bei peroxidasemarkiertem Antikörper wurde mit 0.5 mg/ml Chlornaphthol und 0.5 ul H_2O_2 /ml entwickelt; bei phosphatasemarkiertem Antikörper in 100 mM Natriumcarbonatpuffer pH 10 mit 0.5 mg/ml BCIP (= 5-Brom,4-Chlor,3-Indolylphosphat). Alternativ dazu wurde der Primärantikörper mit Protein A, das mit J^{125} markiert wurde, nachgewiesen.

2.12 Enzymgekoppelter Immuntest (ELISA)

Der ELISA Test ist von Frasch (1985) beschrieben.

2.13 Methoden zum funktionellen Nachweis eines "nuclear location signal" (NLS)

a. Kopplung des "NLS"-Peptids an Serumalbumin (Goldfarb, 1986)

In diesem Experiment sollte sichergestellt werden, daß das Peptid nur an einer einzigen Stelle kovalent mit dem Trägerprotein verknüpft ist. Mit der sog. "MBS" Methode kann eine kovalente Bindung zwischen einer Aminogruppe und einer Thiolgruppe geschlossen werden. Deshalb wurde in das "NLS"-Peptid zusätzlich carboxyterminal ein Cysteinrest eingeführt, über den die monovalente Kopplung an das Trägerprotein erfolgte.
Für die Kopplung wurde folgendes Protokoll verwendet: Zu einer Lösung von 10 mg BSA in 2 ml PBS wurden unter Rühren tropfenweise 5 mg MBS (m-Maleimidobenzoyl N-Hydrosuccinimidester) in 0.5 ml Dimethylformamid zugegeben und eine weitere Stunde bei RT gerührt; dabei wurden Aminogruppen des Proteins acyliert. Modifiziertes Protein wurde über eine Sephadex G-25 Säule (Säulenvolumen 5 ml), die mit 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 6 äquilibriert war, gereinigt. Die Aufarbeitung des MBS-BSA mußte schnell und in der Kälte erfolgen, da die Maleimidgruppe hydrolyseempfindlich ist. MBS-BSA enthaltende Fraktionen wurden kombiniert und unter Rühren mit 5 mg/ml "NLS"-Peptid (2 mg Peptid auf 1 mg MBS-BSA) sukzessive versetzt. Die Reaktion wurde für 1 h bei RT fortgesetzt. Nicht gekoppeltes Peptid wurde anschließend durch Chromatographie über Sephadex G 25, das mit 0.1 M NH_4HCO_3 äquilibriert war, abgetrennt.

b. *In vitro* System zum Nachweis selektiven Kerntransports

Xenopusspermienkerne (Lohka und Masui, 1983) wurden in einem Eiextrakt aus elektrisch aktivierten Eiern (Dreyer et al., 1986) inkubiert, dem "NLS"-BSA (5 mg/ml in PBS; s.o.) zugesetzt war.

Versuchsansatz:	150 ul	aktivierter Eiextrakt
	3 ul	0.5 M Kreatinphosphat
	3 ul	1 mg/ml Kreatinkinase
	7,5 ul	Spermienkerne (5 x 10^7/ml)
	16 ul	5 mg/ml "NLS"-BSA bzw. BSA

Die Spermienkerne verhalten sich wie Pronuclei *in vivo*, indem sie sich abrunden und bis zu einem tausendfachen ihres ursprünglichen Volumens anschwellen. Die Aufnahme von Proteinen aus dem Eiextrakt wurde durch indirekte Immunfluoreszenz an Ausstrichpräparaten überprüft. Zur Detektion von BSA und "NLS"-BSA wurde affinitätsgereinigter Anti-BSA-Antikörper verwendet.

3. Fliegen, Embryonen, Histologie

3.1 *Drosophila* Zucht

Die Fliegenzucht erfolgte in Futterbechern unterschiedlicher Größe, je nach der gewünschten Anzahl an Nachkommen. Die Stammhaltung (bis zu 50 Fliegen) erfolgte in kleinen Bechern (30 ml), die Anzucht größerer Mengen von Fliegen in "mittleren" (bis zu 100) und "großen" Bechern (190 ml). Die Becher sind zu 1/4 mit Fliegenfutter gefüllt und werden zusätzlich mit etwas frischer Bäckerhefe und einem Faltenfilter versehen. Die Fliegen sollten im Abstand von 10 Tagen auf frisches Futter gesetzt werden.

Für Kreuzungen wurden Jungfrauen benutzt, die bei Raumtemperatur alle 10 h abgesammelt wurden.

Standardfliegenfutter pro Liter: 8 g Agar, 18 g Trockenhefe, 10 g Sojamehl, 80 g Maismehl, 7 g Rübensirup, 80 g Malzextrakt und 6.3 ml Propionsäure. (Nüsslein-Volhard, 1977)

3.2 Mutanten und Stämme

Als Wildtypstamm von *Drosophila melanogaster* wurde *Oregon R* verwendet. Markermutationen und Balancer sind in Lindsley und Grell (1968) und Lindsley und Zimm (1986) beschrieben.
Sämtliche Stämme wurden der Stammsammlung von Dr. C. Nüsslein-Volhard entnommen. Genauere Angaben in: Tübingen mutants and stocklist, R. Tearle und C. Nüsslein-Volhard (im Druck).

3.2.1 Maternale Mutanten

Folgende Tabelle gibt die in der Arbeit verwendeten Loci an:

Locus		Allel	Marker
Bicaudal-D	*BicD*	*7134*	*pr cn sca*
		IIIE48	*b cn*
bicoid	*bcd*	*E1*	*th st ri roe pp*
		E2	*ru st e*
		E4	*st e*
		E5	*ri roe pp*
		2-13	*th st cp in ri pp*
		085-13	*ru st e ca*
dorsal	*dl*	*1*	*b pr cn vgD*
exuperantia	*exu*	*PJ*	*b pr cn sca bw*
		QR	*cn bw*
nanos	*nos*	*L7*	*st e*
oskar	*osk*	*166*	*th st in ri roe pp*
		255	*ru st e ca*
pumilio	*pum*	*680*	*ru st e ca*
snail	*sna*	*IIG05*	*cn bw sp*
staufen	*stau*	*D3*	*b pr*
		G2	*b pr*
swallow	*swa*	*1497*	*sc ec cv*
torso	*tor*	*WK 34*	*b cn bw*
		HH 36	*b cn bw*
		PM 51	*b cn bw*
		RL3	*cn bw*
torsolike	*tsl*	*146*	*th st cp in ri pp*
trunk	*trk*	*HD*	*cn bw*
		PI57	*cn bw*
tudor	*tud*	*WC 8*	*cn bw sp*
vasa	*vas*	*PD 23*	*cn bw*

Einige Mutanten wurden in trans zu Defizienzen untersucht; folgende Defizienzen wurden verwendet:

Df (1) JF 5	enthält *swa*
Df (2) A 72	enthält *vas*
Df (2) PC 4	enthält *stau*
Df (3) LIN	enthält *bcd*

Folgende Doppelmutanten wurden untersucht:

bcd osk	:	*st* bcd^{E2} p^{p} osk^{166}
bcd tsl	:	*th st ri* bcd^{E1} *roe* p^{p} *e* tsl^{035}
exu BicD	:	$BicD^{IIIE}$ *pr cn* exu^{PJ} *bw; dp b* $BicD^{7134}$ *cn* exu^{PJ} *bw*
exu stau	:	*cn* $stau^{HL}$ exu^{PJ} *bw*
exu tor	:	tor^{WK} *cn* exu^{PJ} *bw*
osk tsl	:	*st ri roe* p^{p} osk^{166} *e* tsl^{691} *ca*

3.2.2 Zygotische Mutanten (außer *Krüppel*)

Locus		Allel	Marker
engrailed	*en*	*I O34*	*cn bw sp*
even skipped	*eve*	*R 13*	*b pr*
forkhead	*fkh*	*3*	*ru h th st cu sr* e^{s} *ca*
fushi tarazu	*ftz*	*9 O93*	*ru h th st cu sr* e^{s} *ca*
giant	*gt*	*YA*	*w*
hairy	*h*	*IK93*	+
hunchback	*hb*	*6N47*	*st*
		7M48	*ru h th st cu sr* e^{s} *ca*
		9Q17	*ru h th st cu sr* e^{s} *ca*
		14F21	*st e*
		FB92	*ru st e ca*
knirps	*kni*	*IL26*	+
		1-19	*st e*
		301	*th st cp in ri p*
		357	*th st cp in ri p*
		FC13	*ru st e ca*
odd paired	*opa*	*IIP32*	+
odd skipped	*odd*	*.36*	*b Adh pr cn sca*
paired	*prd*	*2.45*	*b Adh pr cn sca*
runt	*run*	*YC47*	*w*
sloppy paired	*slp*	*7L48*	+
tailless	*tll*	*L10/22*	+

3.2.3 Verwendete *Kr* Allele

Die verwendeten *Kr* Allele sind in Preiss (1985) beschrieben.

Allel	Marker
2	*cn bw sp*
3	*cn bw sp*
7	*b pr cn wxt If*
8	*b pr cn wxt If*
9	*b pr cn wxt If*
J1	*m(2)* H^{S5}
IV	*b pr cn wxt If*
IO66	*cn bw sp*
IIE57	*cn bw sp*
V	*b pr cn wxt If*
VII	*b pr cn wxt If*
VIII	*b pr cn wxt If*
IX	*b pr cn wxt If*
X	*b pr cn wxt If*
XI	*b pr If*
XII	*b pr cn wxt If*
21-1-6	von E. Wieschaus, Princeton, zur Verfügung gestellt
62-14	von E. Wieschaus, Princeton, zur Verfügung gestellt

3.3 Sammeln von Embryonen

Zur Ablage von Eiern wurden die Fliegen in luftdurchlässigen Plastikbehältern gehalten. Die Eiablage erfolgte auf Apfelsaft-Agarplatten, die mit Traubensaft und frischer Bäckerhefe bestrichen wurden (Preiss, 1985). Nach der Ablage wurden die Embryonen mit einem weichen Pinsel von der Platte genommen und gründlich mit Wasser/ 0.1% Triton gewaschen.

3.4 Lebendbeobachtung von Embryonen

Zur Untersuchung der Morphologie der Malpighigefäße wurden lebende Embryonen verwendet. Die Malpighigefäße sind im Durchlicht gut sichtbar und erscheinen als dunkle "Schläuche" im posterioren Bereich der Larve.
Lebende Embryonen können im Mikroskop untersucht werden, wenn sie von Hefe o.ä. befreit und dann mit dünnflüssigem Paraffinöl überschichtet werden. Aufgrund seines Brechungsindex läßt Paraffinöl das Chorion transparent erscheinen.

3.5 Kutikulapräparate (nach Van der Meer, 1977)

Nach mindestens 24 h Entwicklung bei Raumtemperatur wurden die nicht geschlüpften Embryonen von der Platte abgesammelt und gründlich gewaschen. Das Chorion wurde mit Eau de Javelle (Klorix) abgelöst. Nach gründlichem Waschen wurde entweder zuerst die Vitellinmembran mechanisch entfernt, oder die Embryonen wurden direkt in Glycerin/Eisessig (1:4; 1 h, 60 ^{o}C) fixiert, gewaschen und in Hoyer´s

Einbettungsmittel (s.u.) auf dem Objektträger ÜN bei 60° C inkubiert. Nach dieser Behandlung bleiben nur noch chitinöse Strukturen der Embryonen erhalten, die nun im Phasenkontrast genauer analysiert werden können.

Hoyer´s Einbettungsmittel: 30 g Gummi arabicum werden in 50 ml Wasser ÜN gerührt. Danach werden 20 g Chloralhydrat zugegeben; nachdem sich dieses gelöst hat, wird die Lösung mit 20 g Glyzerin versetzt. Schwebeteile werden durch Zentrifugation entfernt (30´, 15000 Upm).

3.6 Injektion von RNA in junge Embryonen

Es wurden ungefähr 20 min alte Ablagen von Fliegen auf Apfelsaft-Agarplatten gesammelt. Das Alter der Embryonen wurde individuell unter Phasenkontrast unmittelbar vor der Injektion bestimmt. Embryonen, die das Polzellstadium überschritten haben, wurden nicht injiziert. Die dechorionierten Embryonen wurden auf einem Agarblöckchen mit Hilfe einer Nähnadel orientiert und auf ein Deckgläschen transferiert, das mit etwas Klebstoff beschichtet ist (Tesa in Heptan). Dieses Deckgläschen wurde zur besseren Handhabung auf einen Objektträger aufgebracht. Die Embryonen wurden ca. 15 min über Silicagel getrocknet, mit Voltaleff 10S Öl beschichtet und mit Hilfe eines Mikromanipulators injiziert. Nach der Injektion wurden die Embryonen mit weiterem Öl überschichtet und in einer feuchten Kammer für 2 d ihrer Entwicklung überlassen. Anschließend wurden Kutikulapräparate wie unter 3.5 beschrieben angefertigt. (Holtkamp, 1985).

Für die "rescue"-Experimente wurde die Embryonen heterozygoter Kr^1 Mütter verwendet, wobei das Kr^1 Chromosom einen *Ddc* (Dopa Decarboxylase)Kutikulamarker (Wright et al., 1976) trägt. Homozygote *Ddc*

Embryonen haben unpigmentierte Kutikulastrukturen; dadurch lassen sich die homozygot *Ddc*-markierten *Kr* Embryonen eindeutig von ihren Geschwistern unterscheiden.

3.7 Histologische Methoden

3.7.1 Rasterelektronenmikroskopie von *Drosophila* Embryonen (nach Turner und Mahowald, 1976)

Embryonen definierten Alters wurden dechorioniert (s.3.5) und, um die Vitellinmembran für das Fixativ permeabel zu machen, für 1´ in Heptan, das mit 25% Glutaraldehyd gesättigt wurde, getaucht. Die Fixierung erfolgte in 2,5% Glutaraldehyd, 4% Paraformaldehyd in PBS. Nach 10-30´ wurde die Vitellinmembran mit Wolframnadeln entfernt, und die Embryonen wurden bei 4 °C ÜN im Fixativ belassen. Nach mehreren Waschschritten (PBS) wurden die Embryonen 1 h in 1% Osmiumtetroxid (in PBS) nachfixiert, erneut gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nach der Kritischen-Punkt-Trocknung wurden die Objekte in einer Blazars 120B Apparatur mit Gold-Palladium bedampft und mit einem Siemens ETEK Autoscan photographiert.

3.7.2 Antikörperfärbung von "whole mount" Embryonen

Embryonen wurden dechorioniert (s. 3.5) und in 20 ml Szintillationsgläschen überführt. Die Fixierung erfolgte unter starkem Schütteln in 2 ml 4% Paraformaldehyd (in 0.1 M Hepes pH 6.9, 2 mM $MgSO_4$, 1 mM EGTA) und 8 ml Heptan. Nach der Fixierung wurde die wäßrige Phase abgenommen, 10 ml Methanol zugefügt und das Gläschen 30´´ stark ge-

schüttelt, um die Embryonen chemisch zu devitellinisieren. Embryonen, deren Vitellinmembran entfernt ist, sinken auf den Boden des Gläschens; sie wurden mehrfach mit reinem Methanol gewaschen und konnten dann bei 4 °C wochenlang gelagert werden.

Die Rehydrierung der Embryonen erfolgte in BBT (s. folgende Seite unten). Nach dreimaligem Wechsel des BBT Mediums (Inkubation je 30´) wurden die Embryonen mit Primärantikörper ÜN bei 4 °C inkubiert; die Konzentration des Antikörpers beträgt je nach Affinität und Präparation 1-10 ug/ml. Anschließend wurden die Embryonen zweimal mit BBT gewaschen (20´); unspezifische Bindungsstellen des Sekundärantikörpers wurden durch Zugabe von 5% speziesspezifischem Normalserum in BBT blockiert (2 Inkubationen à 20´).

Darauf erfolgte die Inkubation der Embryonen mit dem Sekundärantikörper. Dieser mußte vor seiner Verwendung von unspezifischer Aktivität gereinigt werden. Dies wurde durch ÜN Inkubation der konzentrierten Antikörperlösung (1:10 in BBT) mit Embryonen aus einem Übernachtgelege erreicht, die wie oben angegeben fixiert und rehydriert worden waren.

Sekundärantikörper sind mit verschiedenen Markierungen erhältlich. Neben Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, werden insbesondere biotinylierte verwendet. Der kommerziell erhältliche biotinylierte Ziege-anti-Hase-Antikörper (CAMON) wurde in einer Endverdünnung von 1:500 verwendet; der FITC markierte Ziege-anti-Hase-Antikörper (DIANOVA) wurde 1:100 verdünnt. Die Inkubation der Embyronen mit Sekundärantikörper erfolgte für 2-4 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Embryonen gründlich mit PBT (s.u.) gewaschen, um Reste von Serumalbumin, das die weitere Prozedur stören würde, zu entfernen.

Biotinylierter Sekundärantikörper wurde nun mit einem stöchiometrisch definierten Streptavidin-Biotin-Komplex komplexiert, an dessen Streptavidinanteil Meerrettich-Peroxidase oder Glucose-Oxidase gekoppelt sind. Gemäß Firmenprotokoll (CAMON) ist zunächst der Streptavidin-Biotin-Komplex herzustellen, mit dem dann die Embryonen für mindestens 30´ zu inkubieren sind.

Peroxidase wurde mit Diaminobenzidin (0.5 mg/ml in PBT) und 0.01% H_2O_2 nachgewiesen. Man erhält ein dunkelbraunes, wasser- und alkohol-unlösliches Präzipitat. Glucoseoxidase wurde mit einem kommerziell (CAMON) erhältlichen Färbekit nachgewiesen (blaues, wasserlösliches Präzipitat).

Für Doppelfärbungen mit *Kr/hb* oder *hb/ftz* Antikörpern wurde folgende Strategie eingeschlagen: Parallele Inkubation mit *ftz* bzw. *Kr* Antikörper, der im Hasen hergestellt wurde, und *hb* Antikörper aus der Ratte. Anschließend wurde das Färbeprotokoll für die Braunfärbung absolviert (also *ftz* oder *Kr*), und in einem zweiten Durchgang die Blaufärbung (also *hb*).

Nach Beendigung der Färbung wurden die Embryonen mehrfach mit PBT gewaschen, mit absolutem Ethanol (4x 20´) dehydriert und in GMM (s. folgende Seite unten) montiert.

BBT: 10 mM Tricinebase, 55 mM NaCl, 40 mM KCl, 7 mM $MgCl_2$, 5 mM $CaCl_2$, 20 mM Glucose, 50 mM Saccharose, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Tween 20; pH 6.9.

PBT: PBS, 0.1 % Tween 20.

GMM: 1.5 mg/ml Kanadabalsam (sialinsäurefrei; PROMOCHEM) in Methylsalicylat. Kanadabalsam ist im Mörser fein zu zerreiben und sukzessive unter Rühren dem Methylsalicylat zuzugeben. Die Suspension

muß mindestens 2 d gerührt werden, bis sich die feinen Teile des Kanadabalsams gelöst haben.

3.7.3 *camera lucida* Auswertung von antikörpergefärbten "whole mount" Embryonen

Zur Auswertung wurden Embryonen im mittleren Blastodermstadium verwendet, deren Orientierung es erlaubte, auf die sagittale Ebene zu fokussieren. Von diesen Embyronen wurden unter Benutzung einer Nomarski-Interferenzkontrastoptik *Camera lucida*-Zeichnungen angefertigt. Die Konturen der Embryonen und der durch Antikörperfärbung sichtbar gemachten Proteindomänen wurden gezeichnet. Die Längsachse der Embryonen und der Schnittpunkt der durch Geraden approximierten Grenzen der Proteindomänen mit der Längsachse wurden bestimmt. Dieser Schnittpunkt wurde in % EL umgerechnet und dient als Angabe für die Position von Domänengrenzen.

Meßfehlerabschätzung: Der Meßfehler bei der *camera lucida*-Zeichnung beträgt ungef. 1%. Darüberhinaus besitzt die Proteinfärbung selbst eine gewisse Variabilität; dies ist z.T. technisch bedingt (Variabilität von "Batch" zu "Batch"), z.T. ist dafür die Variabilität der Embryonen selbst verantwortlich (Variabilität innerhalb des "Batches"). Insbesondere bei der Bestimmung der Proteindomänengrenzen von *hb* und *Kr* ist durch das graduelle "Ausschleichen" der Färbung die Grenzziehung erschwert. Die Verteilung des Proteins innerhalb der Domäne wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Insgesamt ist der Meßfehler wohl auf mindestens 2% abzuschätzen, d.h. exakte quantitative Aussagen sind nicht möglich. Zur Überprüfung der *camera lucida* Messungen wurden daher

Doppelfärbungen (mit *Kr/hb* bzw. *hb/ftz* Antikörpern) durchgeführt. Im Fall der Untersuchung von *hb* und *kni* Embryonen dienten *Kr/hb* Doppelfärbungen zur Identifikation der mutanten Embryonen.

3.7.4 Indirekte Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten von Embryonen

Fixierung der Embryonen wie oben angegeben. Die Rehydrierung der Embryonen erfolgte in Puffer B (s.u.). Anschließend wurden die Embryonen in 10% Gelatine (37 °C) eingebettet. (Details s. Frasch, 1985). Man läßt die Gelatineblöcke im Kühlraum erkalten und taucht sie dann in Isopentan, das mit flüssigem Stickstoff gekühlt ist. Die Blöcke wurden auf -20 °C temperiert; im Kryostat wurden 10 um dicke Schnitte angefertigt. Die Immunfärbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: 1 h 1% BSA in PBS; 1 h Primärantikörper in 0.1 % BSA, 0.1 % Tween 20 in PBS; 3x Waschen mit 0.1% Tween 20 in PBS (=PBT); 30´ Sekundärantikörper (FITC-konjugierter Ziege-anti-Hase-Antikörper (Dianova) 1:100); 3x Waschen mit PBT; 3´ Kernfärbung mit DAPI (1 ug/ml in PBS); Montieren der Embryonen in 85% Glycerol.

Puffer B: 10 mM Kaliumphosphat; pH 6.8, 45 mM KCl, 15 mM NaCl, 15 mM $MgCl_2$.

3.7.5 Indirekte Immunfluoreszenz auf Polytänchromosomen von Speicheldrüsen

Die Quetschpräparate wurden angefertigt wie bei Frasch (1985) beschrieben; die Antikörperfärbung erfolgte gemäß 3.7.4.

3.7.6 Indirekte Immunfluoreszenz auf Schnitten von Hühnchenembryonen

Die Herstellung der Schnitte erfolgt wie in Gaul (1985) beschrieben, mit dem Unterschied, daß jetzt das Material unfixiert geschnitten wurde und daß die Schnitte anschließend sofort in Methanol/Aceton (40:60, 10´, -20 °C) fixiert wurden.

3.7.7 *In situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten von Embryonen

In situ Hybridisierungen wurde nach einem nicht publizierten Protokoll von P. Ingham et al. durchgeführt.

a. Einbetten der Embryonen in Paraffin

Die Embryonen wurden fixiert wie unter 3.7.2 beschrieben und anschließend in Methanol/EGTA (90 ml:10 ml 0.5 M EGTA) gewaschen. Die Rehydrierung erfolgte in folgenden Schritten:

70	Methanol/EGTA :		30	Paraformaldehyd/PBS (4%)	5´
50	" :		50	"	5´
30	" :		70	"	5´
			100	"	20´
			PBS		5´

Anschließend wurden die Embryonen in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert:

30 % Ethanol	10´
50%	10´
70%	10´
95% Ethanol/ 1% Eosin	10´
2x 100% Ethanol	10´

Die Embryonen wurden darauf in Paraffin eingebettet:

2x Xylol	je 10´
2x Xylol: Paraffin (50:50)	je 10´
4x Paraffin	je 10´

b. Vorbehandlung der Objektträger

Normale Objektträger wurden gründlich gereinigt, in destilliertem Wasser gewaschen und bei 150 ^{o}C 1 h getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden die Objektträger in 50 ug/ml Poly-D-Lysin in 10 mM Tris, pH 8 getaucht und anschließend bei Raumtemperatur staubfrei luftgetrocknet.

c. Vorbehandlung der Schnitte

Zunächst wurden die Schnitte entwachst: 2x 10´ Xylol, absteigende Alkoholreihe: 100, 95, 80, 60, 30 % Ethanol für je 2´.

Anschließend wurden die Schnitte 20´ bei RT in 0.2 N HCL getaucht, 5´ mit ddH_2O gewaschen, 30´ in 2 x SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M Natriumcitrat, pH

7.5) bei 70 °C inkubiert, erneut in ddH_2O 5´ gewaschen und schließlich für 10´ mit Pronase verdaut (0.125 mg/ml Pronase in 50 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA).

Die Schnitte wurden 2x für 30´´ in 0.2% Glycin in PBS getaucht, 2x 30´ in PBS gewaschen und anschließend 20´ bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd in PBS nachfixiert. Danach wurden die Schnitte 3x 5´ in PBS gewaschen.

Darauf wurden die Schnitte in 600 ml 0.1 M TEA Puffer (Triethanolamin pH 8) eingetaucht, dem unter schnellem Rühren 3 ml Acetanhydrid zugegeben wurden. In dieser Lösung wurden die Objektträger für weitere 10´ belassen, anschließend 2x 5´ in PBS gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30, 60, 80, 95, 100 % Ethanol; je 2´) dehydriert und dann luftgetrocknet.

d. Hybridisierung

Die Probe wurde hergestellt wie unter 1.3 beschrieben. Die Probe wurde auf die Schnitte aufgebracht, die dann mit einem Deck"glas" aus Plastik luftblasenfrei bedeckt wurden. Die Schnitte wurden ÜN bei 50 °C in einer abgedichteten Kammer, die mit Waschpuffer (s.u.) äquilibriert wurde, inkubiert. Es folgten mehrere Waschschritte: 1 h bei 50 °C, 1 h bei 42 °C und 4 h bei 42 °C. Dem Waschpuffer (s.u.) sind 10 mM DTT zugesetzt.

Die Schnitte wurden darauf 5´ in 1x NTE (s.u.) bei 37 °C inkubiert, 30´ mit 20 ug/ml RNase A (in NTE; 37 °C), 4x mit 1x NTE gewaschen (insgesamt 1 h) und in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (30, 60, 80, 95 % Ethanol und 0.3 M Ammoniumacetat, dann 100% Ethanol; je 2´) und luftgetrocknet.

Waschlösung: 0.3 M NaCl, 10 mM Tris pH 6.8, 10 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA; 50 % Formamid.

NTE: 0.5 M NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA.

e. Autoradiographie der Gewebeschnitte

Die Photoemulsion (Ilford K2; Verdünnung 1:1) wurde direkt vor Gebrauch geschmolzen und in die "Dipping" Küvette eingefüllt. Die Objektträger wurden in die Photoemulsion "gedippt", bei vollständiger Dunkelheit für 2 h getrocknet und zur Exposition in einer lichtdichten Box aufbewahrt.

Die Entwicklung der Photoemulsion erfolgte bei vollständiger Dunkelheit: Die Objektträger wurden für 2´ in D19 Entwickler getaucht, 5´ in dH_2O, 4´ in Fixativ. Sämtliche Lösungen waren auf 15 ^oC vorgekühlt.

Anschließend wurden die Objektträger 10´ mit dH_2O, 5´ mit PBS pH 6.8 gewaschen und für 5´ in Giemsalösung (1:20 in PBS pH 6.8) gefärbt. Die Schnitte wurden nochmals mit PBS pH 6.8 gewaschen (1´), dann 1´ zur Neutralisierung mit leicht basischem Wasser gewaschen, kurz in destilliertes Wasser getaucht und für 1 h getrocknet. Die Schnitte wurden in Entellan eingebettet

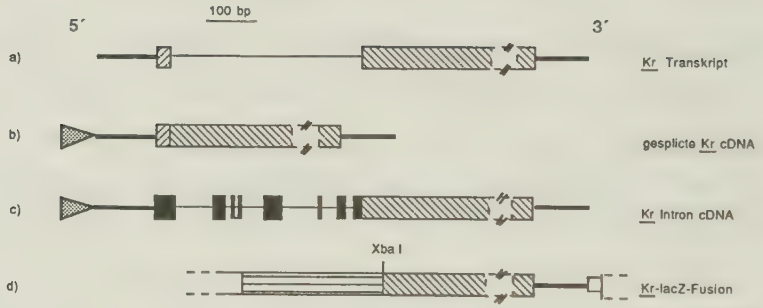


Abb. 1 Schematische Darstellung der *Kr* Transkripte und der aus ihnen hergestellten Konstrukte.

(a) Das 2.5 kb *Kr* Transkript setzt sich aus einer nicht translatierten "leader" Sequenz (—), der *Kr* kodogenen Sequenz (▨ ▧) und einer 3´ nicht translatierten Region zusammen (—). Die kodogene Region wird von einem 372 bp Intron (—I—) unterbrochen.
(b), (c) *Kr* cDNA Konstrukte, die eine in vitro Transkription von *Kr* mRNA mit Hilfe der SP6 Polymerase erlauben (▶ : SP6 Promoter). (b) Gespleißte *Kr* cDNA; (c) Intron-enthaltende *Kr* cDNA. Das große offene Leseraster wird im Intron unterbrochen, darüberhinaus befindet sich im Intron eine Anzahl kurzer offener Leseraster (▌). Am 3´ Ende des Introns liegt ein Startkodon, dessen Leseraster in das große offene Leseraster des *Kr* Proteins "einmündet".
(d) LacZ-*Kr* Fusionskonstrukt (bzw. pPTH-*Kr*-Fusionskonstrukt). Das XbaI Fragment des *Kr* pcK2b Klons (Rosenberg et al., 1986) wurde in die XbaI Schnittstelle des pUR 278 (bzw. des pPTH 10) Vektors kloniert, so daß das offene Leserater der ß-Galaktosidase (bzw. des pPTH Produkts) (▤) sich in das offene Leseraster der *Kr* Sequenz fortsetzt.

III. Ergebnisse

1. Untersuchungen am *Kr* Protein

Die Homologie zum Transkriptionsfaktor TF IIIA von *Xenopus* (Rosenberg et al., 1986) läßt eine nukleäre Lokalisation des *Kr* Proteins erwarten. Mit Hilfe von Antikörpern, deren Herstellung und Charakterisierung im folgenden zunächst beschrieben sei (1.1; 1.2), konnte nachgewiesen werden, daß das *Kr* Protein tatsächlich im Zellkern lokalisiert ist (1.3). An diesen Befund schlossen sich Experimente an, die zur Identifikation der Aminosäuresequenz führten, die für die Lokalisation des *Kr* Proteins im Zellkern verantwortlich ist ("nuclear location signal") (1.4).
Die Analyse *Kr*-homologer Gensequenzen in Drosophila hat gezeigt, daß deren Homologie sich auf einen kurzen Abschnitt innerhalb der potentiellen DNA-Bindungsdomäne des Proteins beschränkt (Schuh et al., 1986). Gegen die konservierte Sequenz wurden Peptidantikörper hergestellt; mit deren Hilfe wurde die zelluläre Lokalisation von Antigenen, die dieses Epitop besitzen, in *Drosophila melanogaster* und anderen Spezies untersucht (1.5).

1.1 Herstellung der *Kr* Antikörper

Zur Herstellung polyklonaler Kaninchenantikörper gegen das *Kr* Protein wurde als Antigen ein ß-Galaktosidase-*Kr* Fusionsprotein verwendet. Die lacZ-*Kr*-Genfusion enthält 94 % der kodierenden *Kr* Sequenz fusioniert an das 3´ Ende des lacZ Gens (s. Abb. 1). Mit diesem rekombinanten Plasmid wurden Bakterien des Stammes 71-18 transformiert; die Expression des Fusionsproteins wurde durch Gabe von IPTG induziert. Eine Auftrennung

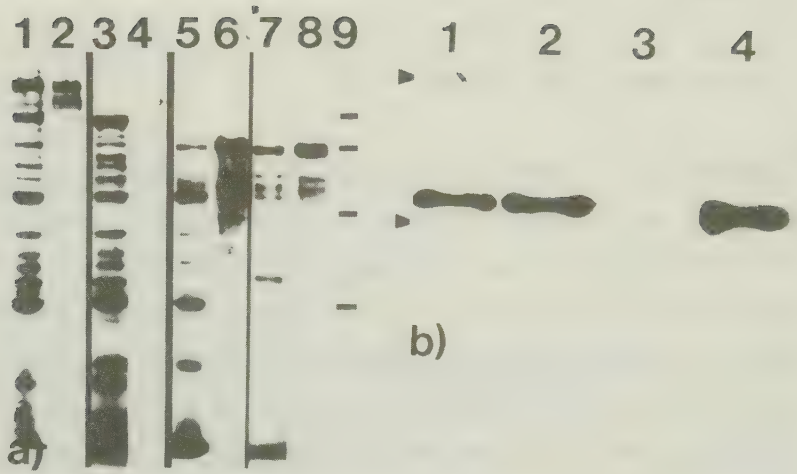


Abb.2 Charakterisierung der *Kr* Antikörper

(a) Coomassie gefärbte SDS-PAGE (Spalten 1,3,5,7) und damit korrespondierende "Westernblots" (Spalten 2,4,6,8), die eine Auftrennung des Gesamtlysats aus IPTG induzierten Bakterien zeigen. Spalte 1 und 2: pUR 278-*Kr* Transformanten, die lacZ-*Kr* Fusionsprotein produzieren; Spalte 3 und 4: pUR-Vektor Transformanten, die ß-Galaktosidase produzieren; Spalte 5 und 6: pATH-*Kr* Transformanten, die trpE-*Kr* Fusionsprotein produzieren; Spalte 7 und 8 zeigen gereinigtes trpE-*Kr* Fusionsprotein.
Parallele Gele wurden entweder gefärbt (Spalten 1,3,5,7) oder auf Nitrozellulose "geblottet" und mit affinitätsgereinigten *Kr*-Antikörpern inkubiert. Spalte 4 zeigt, daß die affinitätsgereinigten Antikörper keine Kreuzreaktivität zu ß-Galaktosidase mehr besitzen. Die Position der Molekulargewichtsmarker ist in Spalte 9 abzulesen (116 kd; 97 kd; 66 kd; und 46 kd).
(b) Die affinitätsgereinigten Antikörper erkennen *Kr* Protein, das durch in vitro Translation in vitro transkribierter gespleißter Kr RNA gewonnen wurde. Für die in vitro Transkription wurde das in Abb. 1b beschriebene *Kr* SP6 Konstrukt verwendet. Die so hergestellte *Kr* mRNA wurde in Gegenwart von ^{35}S Methionin in vitro translatiert (Retikulozytenlysat) (Spalte1); das radioaktiv markierte *Kr* Protein konnte von *Kr* Antikörpern (Spalte2), nicht aber von unspezifischem Kaninchen-anti-Maus IgG immunpräzipitiert werden (Spalte3). In Spalte 4 ist das Gesamttranslationsprodukt der in vitro translatierten Intron-haltigen *Kr* RNA aufgetragen. Das apparente Molekulargewicht der beiden Translationsprodukte unterscheidet sich kaum.

des Gesamtproteins induzierter Bakterien ist in Abb. 2 gezeigt. Im Vergleich zu Bakterien, die nur das lacZ Gen exprimieren (3), weisen lacZ-*Kr*-Transformanten (1) im hochmolekularen Bereich zusätzliche Banden auf, die Fusionsprotein enthalten.

Die Fusionsproteinbande mit dem höchsten Molekulargewicht wurde aus dem Gel ausgeschnitten und zur Immunisierung in Kaninchen verwendet. Da der Anteil von *Kr* (44 kD) am Gesamtfusionsprotein (160 kD) nur 27 % beträgt, ist zu erwarten, daß ein großer Teil der Antikörper gegen ß-Galaktosidase gerichtet ist. Um die kontaminierende Aktivität gegen ß-Galaktosidase zu entfernen, wurden die Seren affinitätsgereinigt. Als Antigen für die Affinitätschromatographie wurde gereinigtes trpE-*Kr* Fusionsprotein verwendet (Konstrukt s. Abb. 1; Reinigung s. Abb. 2.5-8). Da keine Kreuzreaktivität zwischen trpE Protein und ß-Galaktosidase besteht, werden nur *Kr*-spezifische Antikörper an das Säulenmaterial gebunden. Auf diesem Wege konnte die kontaminierende Aktivität des Serums gegen ß-Galaktosidase relativ einfach entfernt werden (Abb. 2, Spalte 4).

1.2 Charakterisierung der *Kr* Antikörper

Die *Kr* Antikörper wurden zunächst auf ihre Fähigkeit, natives *Kr* Protein zu erkennen, untersucht. Um für eine Immunpräzipitation ausreichende Mengen an radioaktiv markiertem *Kr* Protein zu erhalten, wurde *in vitro* synthetisierte *Kr* mRNA *in vitro* translatiert.

Kr kodiert zwei Transkripte, die sich durch ein 372 bp Intron unterscheiden. Die cDNA, die die Sequenzen für das gespleißte *Kr* Transkript enthält, wurde in ein Plasmid subkloniert, das DNA mit Hilfe der SP6 Polymerase *in vitro* zu transkribieren erlaubt. Die auf diesem Wege *in*

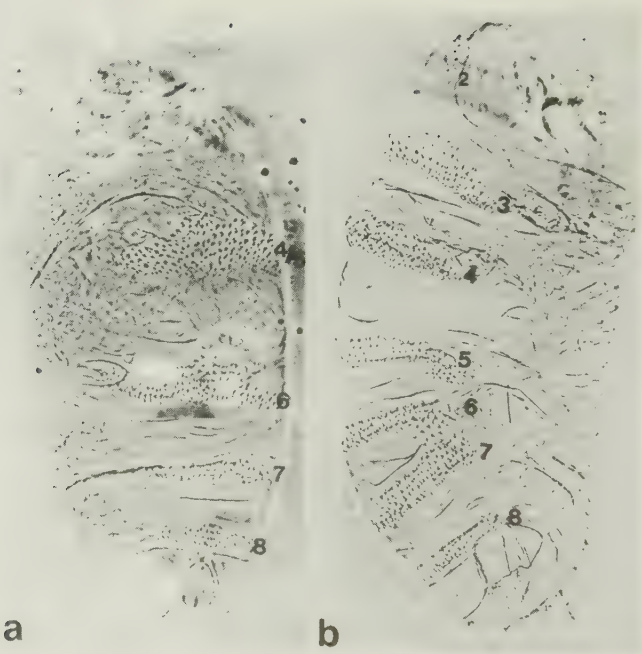


Abb. 3 Kutikulapräparate von *Kr*⁻ Embryonen, deren Phänotyp durch Injektion von *Kr* mRNA "gerettet" wurde.

(a) Intermediärer *Kr* Phänotyp; (b) schwacher *Kr* Phänotyp. Die Ziffern 2-8 bezeichnen die Abdominalsegmente 2-8.

vitro synthetisierte mRNA wurde in einem zellfreien Translationssystem (Retikulozytenlysat) translatiert. Das primäre Translationsprodukt zeigt ein Molekulargewicht von 70 kD im SDS Polyacrylamidgel und wird von den affinitätsgereinigten *Kr* Antikörpern immunpräzipitiert (Abb. 2b).
Das apparente Molekulargewicht des primären Translationsprodukts unterscheidet sich ungefähr um 20 kD von dem theoretisch berechneten Wert (50 777 D). Ein Grund für diese Diskrepanz mag der hohe Prolingehalt (8 %) des Proteins sein, der die elektrophoretische Mobilität des Proteins beeinträchtigt.

Um sicherzustellen, daß die *Kr* Antikörper tatsächlich gegen das biologisch funktionelle *Kr* Protein gerichtet sind, wurde dieselbe mRNA, die auch zur *in vitro* Translation verwendet wurde, in amorphe *Kr* Embryonen injiziert. Wenn die injizierte mRNA *Kr*-Aktivität besitzt, so müßten die Embryonen einen abgeschwächten *Kr* Phänotyp entwickeln, wie dies schon bei Injektion von *Kr* DNA und Wildtypplasma gezeigt worden ist (Preiss et al., 1986 und Jäckle et al., 1985).
Die Injektion von gespleißter *Kr* mRNA (ungef. 200 pg) in die Mitte von Embryonen, die sich im synzytialen Blastodermstadium befanden, hatte zur Folge, daß der überwiegende Anteil der injizierten Embryonen (68 von 86) einen intermediären (Abb. 3a) und einige wenige (8 von 86) einen schwachen *Kr* Phänotyp entwickelten (Abb. 3b). Drei der injizierten Embryonen bildeten sogar ein normales ventrales Muster von Zähnchenbändern aus; interessanterweise zeigten diese Embyronen jedoch noch immer die anteriore Duplikation von Filzkörpermaterial im dorsalen Kopfbereich, die für den extremen *Kr* Phänotyp charakteristisch ist. Offensichtlich wird also durch die Injektion von *Kr* RNA nur die ventrale Segmentierungsstörung aufgehoben. Dieses Ergebnis läßt sich unabhängig

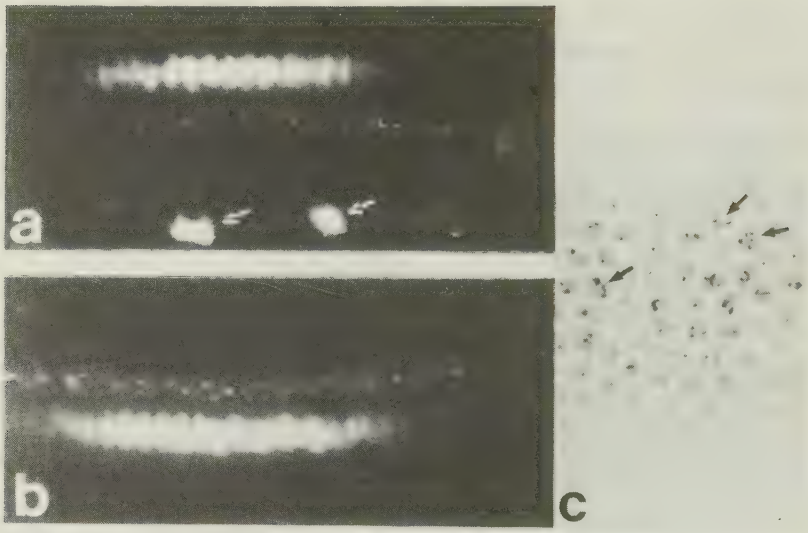


Abb. 4 Intrazelluläres und intranukleäres Muster der *Kr* Antikörperfärbung.

(a),(b) Indirekte Immunfluoreszenz am Gewebeschnitt eines Blastodermembryos, (a) dorsale, (b) ventrale Peripherie. Dotterkerne (Pfeile) innerhalb der *Kr* Domäne sind ebenfalls stark gefärbt. (c) "whole mount" Färbung eines Blastodermembryos; zur Detektion des *Kr* Antikörpers wurde peroxidasemarkierter zweiter Antikörper verwendet. In den Interphasekernen der Peripherie ist ein "Punktmuster" sichtbar (Pfeile).

von der Einstichstelle und unabhängig von der Menge an injiziertem Material reproduzieren; es mag ihm somit insofern biologische Relevanz zukommen, als es regionsspezifische Unterschiede in der Suszeptibilität für *Kr*-Aktivität widerspiegeln könnte.

1.3 Intrazelluläre Lokalisation des *Kr* Proteins

Mit Hilfe der Antikörper konnte die intrazelluläre Lokalisation des *Kr* Proteins sichtbar gemacht werden. In Gewebeschnitten von späten Blastodermembryonen werden nur Kerne angefärbt (Abb. 4a,b). Die Färbung weist dabei keine homogene Verteilung auf, sondern läßt sich als "Punktmuster" (Abb. 4c) beschreiben. Bei Betrachtung verschiedener Phasen des Zellzyklus zeigt sich, daß dieses "Punktmuster" nur während der Interphase, einem Stadium hoher Transkriptionsaktivität, sichtbar ist. Die lokale Akkumulation des *Kr* Proteins könnte als spezifische Anlagerung an definierte Stellen auf den Chromosomen gedeutet werden.

Abb. 5 Bisher veröffentlichte "nuclear localization signal" (NLS) Sequenzen.

Das mutmaßliche *Kr* NLS befindet sich in der *Kr* Proteinsequenz an Position 155-162, ungefähr 60 Aminosäuren vor der Fingerdomäne (vgl. Rosenberg, 1986).

Protein		Sequenz	Ref.
SV 40 large T Antigen		Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val	1,2
Polyoma large T Antigen	(1)	Pro Lys Lys Ala Arg Gln Asp	3
	(2)	Val Ser Arg Lys Arg Pro Arg	3
Hefe H2B-1		Lys Lys Pro Ala Ala Lys Lys	4
Hefe Mat 2	(1)	Asn Lys Ile Pro Ile Lys Asp	4
	(2)	Pro Leu Ala Lys Lys Lys Gln	4
Influenza Virus Kernprotein		Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly	5
Krüppel		Pro Ala Lys Lys Ala Arg Lys Leu	

Referenzen:
1. Kalderon et al. (1984)
2. Lanford und Butel (1984)
3. Richardson et al. (1986)
4. Hall et al. (1984)
5. Davey et al. (1985)

1.4 Identifikation des "nuclear location signal" im *Kr* Protein

Die Kernhülle definiert eine Kompartimentgrenze, die es erlaubt, Transportprozesse in den Kern hinein und aus dem Kern heraus hoch selektiv zu gestalten. So werden z.B. precursor RNAs im Kern zurückgehalten, während prozessierte RNA, tRNA und Ribosomenuntereinheiten ins Zytoplasma transportiert werden. Proteine, die für den Zellkern bestimmt sind, werden bald nach ihrer Synthese bzw. nach einer Kernteilung aufgenommen, während zytoplasmatische Proteine ausgeschlossen werden. Dieser Prozeß ist hoch spezifisch: eine Punktmutation im "large T antigen" des SV 40 Virus, die Lys 128 in Thr oder Asn verwandelt, verhindert den Import des Proteins in den Kern (Kalderon et al., 1984; Lanford und Butel, 1984). Dieser Befund stützt, neben anderen, die Vorstellung, daß Kernproteine Signalsequenzen enthalten, die für ihre Aufnahme in den Kern verantwortlich sind, sogenannte "nuclear location signals" (im folgenden NLS).

Ein Vergleich der bislang bekannten NLS mit der *Kr* Proteinsequenz ergab eine Homologie mit SV 40 und polyoma "large T antigen" Sequenzen (s. Abb. 5).

Da die *Kr* Peptidsequenz aber mit keinem der bisher bekannten NLS vollständig identisch ist, war zu prüfen, ob sie tatsächlich über die Aufnahme eines Proteins in den Kern zu bestimmen vermag.

Um die *Kr* Peptidsequenz als NLS zu identifizieren, wurde folgender Weg eingeschlagen: Ein kommerziell synthetisiertes Peptid, das die relevanten Aminosäurereste enthielt (Pro Ala Lys Lys Ala Arg Lys Leu Ser), wurde über einen zusätzlich angehängten Cysteinrest an Rinderserumalbumin (BSA) monovalent gekoppelt (im Mittel 10 Peptide pro BSA Molekül). Dieses peptidgekoppelte Rinderserumalbumin wurde nun auf seine

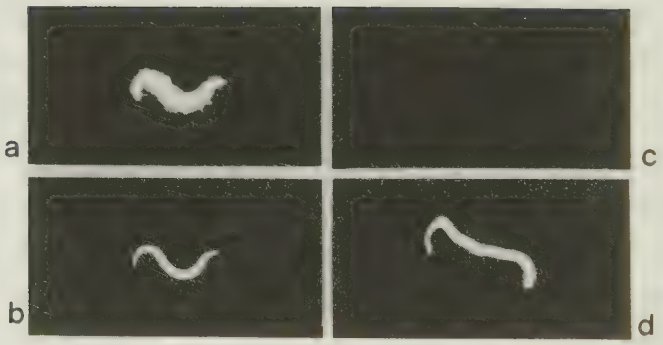


Abb. 6 In vitro Test auf selektiven Kerntransport des *Kr* NLS-BSA.

Indirekte Immunfluoreszenz an Ausstrichpräparaten von Xenopus Spermienkernen, die in einem aktivierten Eiextrakt inkubiert wurden, der mit *Kr* NLS-BSA ((a),(b)) bzw. BSA allein ((c),(d)) versetzt wurde. (a),(c) Indirekte Immunfluoreszenz mit Anti-BSA-Antikörpern; (b),(d) DAPI Färbung zur Sichtbarmachung der Kerne. Die Kerne wurden zu einem frühen Zeitpunkt der Inkubation entnommen und zeigen noch keine Abrundung.

Fähigkeit, in den Zellkern aufgenommen zu werden, untersucht. Da Rinderserumalbumin als solches nicht im Kern akkumuliert, reicht die qualitative Detektion des peptidgekoppelten BSA in Kernen aus. Dies geschah mit Hilfe von Anti-BSA-Antikörpern in der indirekten Immunfluoreszenz.

Die Aufnahme des peptidgekoppelten BSA in den Kern wurde in einem *in vitro* System untersucht. Isolierte Spermienkerne von *Xenopus* verhalten sich in einem zellfreien Extrakt von elektrisch aktivierten Eiern wie Pronuclei *in vivo*; sie runden sich ab und schwellen bis zum tausendfachen ihres ursprünglichen Volumens an; dabei nehmen sie selektiv nukleoplasmatische Proteine in einer definierten zeitlichen Abfolge auf (Dreyer et al., 1986).

Zugabe des peptidgekoppelten BSA zu einem solchen Eiextrakt führte zu einer sehr schnellen und starken Akkumulation des modifizierten BSA in den Spermienkernen, während unmodifiziertes BSA nicht aufgenommen wurde (Abb. 6). Dieses Ergebnis zeigt, daß die *Kr* Peptidsequenz ein NLS darstellt und zumindest unter bestimmten Bedingungen hinreicht, Nicht-Kernproteine in den Kern zu dirigieren. Es ist jedoch noch zu prüfen, ob diese Sequenz auch innerhalb des *Kr* Proteins selbst für dessen nukleäre Lokalisierung (allein) verantwortlich ist, oder ob weitere Sequenzen für den Kerntransport benötigt werden.

Vergleich der bisher bekannten konservierten "fingerlinks"

Kr	(1) TGEKPFE
	(2) TGEKPYH
	(3) TGEKPYT
	(4) TGEKPYE
Krh	(1) TGEKPYE
MKR1	(1) TGEKPYE
	(2) TGEKPFE
	(3) MEKKPYG
	(4) TGERPYE
	(5) TGEKRYE
	(6) TGEKPYE
	(7) TGEKPYE
MKR2	(1) TGEKPYT
	(2) TGEKPYK
	(3) TGEKPYQ
	(4) TGEKPYK
	(5) TGEKPYE
	(6) TGEKPYE
	(7) TGEKPYE
	(8) TGEKPYQ
TFIIIA	(1) TGEKPFP

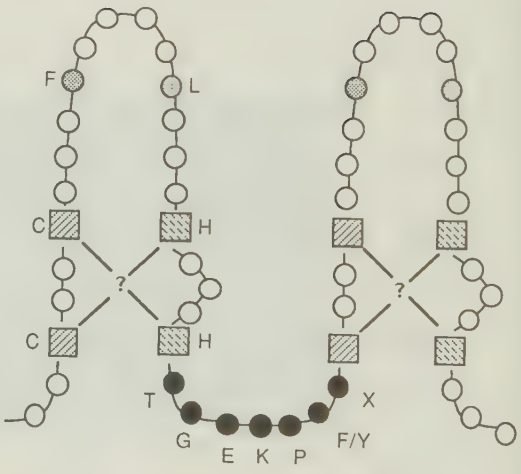


Abb. 7 Zum "finger link".

(a) Bisher bekannte konservierte "finger links". Die Gensequenzen von MKR1 und MKR2 (Chowdhury et al., 1987) sowie von *Krh* (Schuh et al., 1986) wurden aufgrund dieser Homologie im "finger link" "gefischt".
(b) Schemazeichnung zweier DNA-bindender "Finger" im *Kr* Protein, die durch einen konservierten "finger link" miteinander verbunden sind. Für die Struktur der Finger essentielle Aminosäuren sind markiert: Cys (C) und His (H) sind hochkonserviert und an der Komplexbindung eines Metallions (bei TF IIIA Zn^{2+}) beteiligt, Phe (F) und Leu (L) sind ebenfalls konserviert. Der "finger link", dessen Konsensussequenz in TGEKPF/YX besteht, ist hervorgehoben (schwarz).

1.5 Untersuchungen zum "finger link" des *Kr* Proteins

Die Sequenzanalyse des *Kr* Gens deckte eine interessante tandemartige Wiederholung einer Sequenz von 28 Aminosäuren innerhalb der zentralen Domäne des Proteins auf (Abb. 7). Auf eben dieser tandemrepetitiven Sequenz beruht die Homologie des *Kr* Proteins zum Transkriptionsfaktor TF IIIA von *Xenopus*. TF IIIA ist der DNA-bindende Faktor, der zur Transkription des 5S RNA Gens durch Polymerase III benötigt wird. Untersuchungen am TF IIIA Protein haben zu der Modellvorstellung geführt, daß sich die Aminosäurereste einer jeden tandemrepetierten Sequenz zu einem DNA bindenden "loop" oder "Finger" falten (Abb. 7), wobei die Struktur der Schleife intern durch Komplexierung je eines Zinkions stabilisiert sein soll. An der koordinativen Bindung der Zinkionen sollen die hochkonservierten Cystein- und Histidinreste beteiligt sein. Die einzelnen Finger des Moleküls sollen durch flexible "finger links" von 7 bis 9 Aminosäuren verbunden sein (Miller et al., 1985).

Im Gegensatz zu TF IIIA sind nun in *Kr* die Aminosäuresequenzen der "finger links" nahezu miteinander identisch. Gegen ein Dodekapeptid (Thr Gly Glu Lys Pro Phe Glu Cys Pro Glu Cys Asp), das den ersten der *Kr* "finger links" enthält, wurden polyklonale Antikörper hergestellt. Mit ihrer Hilfe konnte eine Anzahl von Antigenen gefunden werden, die dieses Epitop tragen, und es ließen sich erste Aufschlüsse über deren Funktion gewinnen.

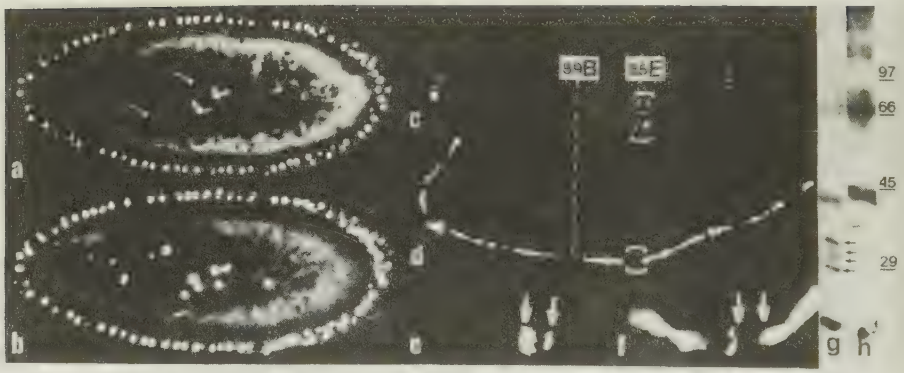


Abb. 8 Verteilung von "finger link"-Antigen(en) auf Gewebeschnitten von Embryonen und auf Polytänchromosomen von Drosophila.

Indirekte Immunfluoreszenz an Schnitten bzw. Speicheldrüsenquetschpräparaten; als Primärantikörper wurde polyklonaler Anti-"finger link"-Antikörper verwendet; zur Sichtbarmachung der DNA wurde mit DAPI gegengefärbt. (a),(b) Parasagittaler Schnitt durch einen Embryo, der das 8. Kernteilungsstadium überschritten hat. Über den Dotterkernen ist kein Signal zu erkennen (Pfeile); (a) indirekte Immunfluoreszenz, (b) DAPI Färbung. (c)-(f) Fluoreszenzsignale (Pfeile) über dem rechten Arm des 3. Chromosoms, so in der Puffregion 85 EF. (c),(e) Indirekte Immunfluoreszenz; (d),(f) DAPI Färbung. Die Abbildungen (d) und (f) sind Vergrößerungen der in (c) und (d) durch Klammern markierten Region. (g),(h) "Westernblots" von Kernextrakten von 0-2 h alten (g) und 4-24 h alten (h) Embryonen. Einige der Banden (Pfeile) können nur in Extrakten von jungen, nicht aber von alten Embryonen nachgewiesen werden.

1.5.1 "finger link" Antigene in Drosophila

Bereits während später Kernteilungsstadien detektieren die Anti-"finger link"-Antikörper nukleäre Antigene (Abb. 8). Da zu dieser Zeit noch keine zygotische Genexpression vorhanden ist (Anderson und Lengyel, 1979), sind Proteine maternaler Herkunft für die Fluoreszenzsignale verantwortlich zu machen.
Interessanterweise weisen die Dotterkerne (Vitellophagen) dieser jungen Embryonen keine Färbung auf (Abb. 8), was eine allgemein konstitutive Funktion der Proteine, die dieses Epitop tragen, ausschließt.
"Westernblots" von embryonalen Kernextrakten zeigen, daß eine Anzahl von Antigenen von den Antikörpern erkannt wird, wobei einige der früh prominenten Banden nach 4 h Entwicklung bereits verschwunden sind (Abb. 8g,h).
Zusammengenommen zeigen diese Daten, daß eine Familie von nukleären Proteinen ein Epitop mit dem *Kr* Protein teilt, nämlich den "finger link", und daß zumindest ein Teil dieser Proteine einer entwicklungsabhängigen Regulation unterliegt.

Es wurde nun geprüft, ob diese im Kern lokalisierten "finger link"-Antigene mit dem Chromatin assoziiert sind. Die Inkubation von Speicheldrüsenquetschpräparaten mit Anti-"finger link"-Antikörpern zeigte, daß auch auf Riesenchromosomen Antigene vorhanden sind. Fluoreszenzsignale sind in einer kleinen Anzahl von Chromosomenbanden, wie auch in Puffs sichtbar (Abb. 8). Dieser Befund läßt eine Interaktion der Antigene mit Chromatin, DNA oder nukleärer RNA zumindest möglich erscheinen.

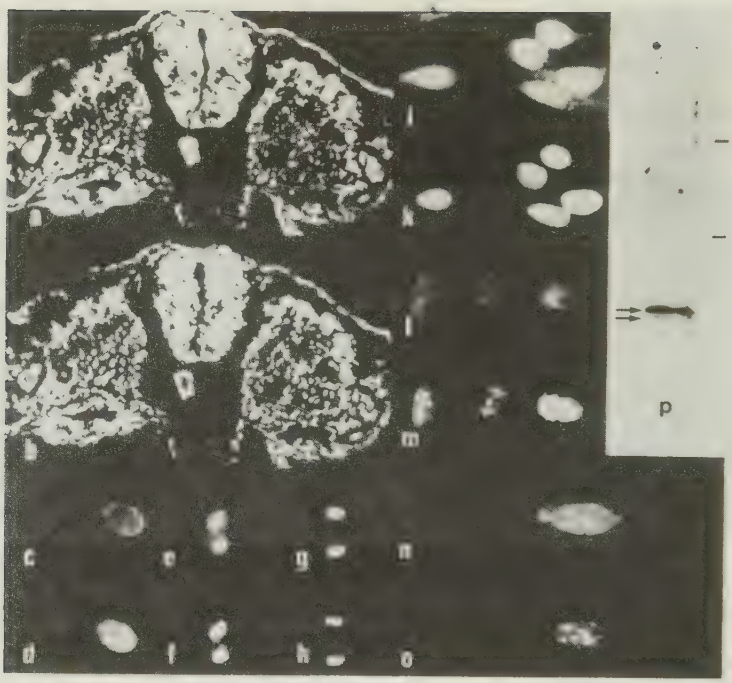


Abb. 9 Verteilung von "finger link"-Antigen(en) auf Gewebeschnitten von Hühnchenembryonen und in Gewebekulturzellen verschiedener Herkunft.

(a),(b) Querschnitt durch einen 2,5 d alten Hühnchenembryo. Der Vergleich von indirekter Immunfluoreszenz (a) und DAPI Färbung (b) zeigt, daß alle Kerne auf den "finger link"-Antikörper ansprechen. (c),(e),(g),(i),(l),(n) Indirekte Immunfluoreszenz auf Gewebekulturzellen verschiedener Herkunft.
(d),(f),(h),(k),(m),(o) Korrespondierende DAPI Färbung. (c) und (d) Human-Fibroblasten (MRC-5); (e) und (f) Ratten-Fibroblasten (NRK) in der Metaphase; (g) und (h) NRK Zellen in der Metaphase; (i) und (k) embryonale Maus-Karzinomzellen (PCC4); (l) und (m) NRK Zellen in der Interphase; (n) und (o) primäre Maus-Fibroblasten von BALB/c Embryonen. (p) Westernblot von Kernextrakten aus PCC4 Zellen. Zwei Banden werden prominent detektiert. Die Striche markieren die Position der Molekulargewichtsmarker (45 kD, 66 kD).
(Quelle der Gewebekulturzellen: MRC-5, NRK: American Tissue Type Culture Collection; PCC4aza1: Nicolas et al.,1975.)

1.5.2 "finger-link" Antigene in anderen Spezies

Da die Fingerstruktur in voneinander so entfernten Spezies wie *Drosophila* und *Xenopus* vorkommt, war zu prüfen, ob auch der "finger link" im Tierreich weiter verbreitet ist.

Sowohl in Embryonen von Huhn und Maus wie auch in Zellinien verschiedener Herkunft (Maus, Rind, Ratte, Mensch) konnte "finger link" Antigen nachgewiesen werden (Abb. 9). In allen Fällen war die Fluoreszenzmarkierung über dem Kern konzentriert, während das Zytoplasma negativ war. Während der Mitose bleibt das Fluoreszenz-signal mit den Chromosomen verknüpft (Abb. 9).

Der "finger link" erweist sich also auch in Vertebratensystemen als mit nukleären Antigenen assoziiert.

2. Die *Kr* Proteindomäne im Blastoderm normaler und mutanter Embryonen

Wie eine Vielzahl von Untersuchungen gezeigt hat, werden während des Blastodermstadiums die wesentlichen Entscheidungen für die spätere Segmentierung des Embryos gefällt. So sind zu diesem Zeitpunkt die zygotischen Segmentierungsgene bereits exprimiert, und das Expressionsmuster der Paarregelgene ist in "Streifen" aufgelöst (s. Übersichtsartikel Scott und O´Farrell, 1986; Akam, 1987). Dies zeigt, daß in einer Art "Vormuster" die embryonale Blastodermanlage bereits in metamere Einheiten unterteilt ist. Die für die Etablierung des Segmentmusters verantwortlichen Gene lassen sich in Klassen zusammenfassen und in eine Hierarchie ordnen (s. Einleitung): maternale Segmentierungsgene -- Gap Gene -- Paarregelgene -- Segmentpolaritätsgene. Diese Anordnung wurde aus der Analyse der Phänotypen der an der Segmentierung beteiligten Gene gewonnen. *Kr* gehört dieser Phänotypanalyse zufolge zur Klasse der Gap Gene.
Um Rückschlüsse auf die Regulation von *Kr* und auf seine Funktion im Segmentierungsprozeß zu erhalten, wurde die Verteilung des *Kr* Proteins im Blastoderm von Wildtypembryonen untersucht und mit der *Kr* Proteinverteilung im Blastoderm verschiedener Segmentierungsgenmutanten verglichen.

Zunächst wurden die Parameter der *Kr* Proteinexpression im Wildtypblastodermembryo mit Hilfe der *Kr* Antikörper bestimmt: Im mittleren Blastoderm reicht die Domäne der *Kr* Proteinexpression von 54 bis 39 % Eilänge (EL); ihre Breite variiert dabei zwischen 10 bis 12 Kernen im dorsalen Bereich und zwischen 14 bis 16 Kernen im ventralen Bereich. Im Gegensatz zur augenscheinlich homogenen Akkumulation von *Kr* Trans-

kript in dieser Region ist die Antikörperfärbung im Zentrum der Domäne am intensivsten und nimmt zu den Grenzen hin ab; dies entspricht einer Glockenkurvenverteilung des *Kr* Proteins entlang der antero-posterioren Achse.

Die Lage und die Ausdehnung der *Kr* Proteindomäne sind in Wildtypembryonen konstant. Eine spezifische Veränderung dieser Parameter in mutanten Embryonen würde also darauf deuten, daß das korrespondierende Wildtypgenprodukt die *Kr* Expression direkt oder indirekt beeinflußt und zur Etablierung der normalen *Kr* Expressionsdomäne benötigt wird. Demgegenüber würde eine gegenüber dem Wildtyp in Lage und Ausdehnung nicht veränderte *Kr* Domäne im mutanten Embryo anzeigen, daß die Funktion des Wildtypgens nicht benötigt wird.

2.1 Die Position von *Kr* in der Hierarchie der Segmentierungsgene

Um die Position von *Kr* innerhalb der Hierarchie der Gene, die für die Etablierung des Segmentmusters verantwortlich sind, zu bestimmen, wurde das *Kr* Proteinmuster in Paarregel-, Gap und maternalen Segmentierungsgenmutanten untersucht.

Embryonen, die homozygot eine Mutation für eines der Gene *runt, hairy, even skipped, fushi tarazu, paired, odd paired, odd skipped* oder *sloppy paired* tragen, entwickeln einen Paarregel-Phänotyp, d.h. die mutanten Embryonen bilden nur die halbe Anzahl von Segmenten aus, da in jeder zweiten Segmenteinheit Musterelemente deletiert sind.

Die *Kr* Proteindomäne ist in homozygoten Embryonen der Paarregelklasse gegenüber dem Wildtypmuster unverändert. Dieser Befund läßt darauf schließen, daß die Aktivität des *Kr* Gens von der Aktivität der Paarregel-

Tabelle1

Die *Kr* Proteindomäne in Mutanten der Segmentierungsklasse.

Komplementationsgruppe (Genotyp)		Position der *Kr* Proteindomäne in % Eilänge	Referenz Phänotyp
Wildtyp		54 (±1) bis 39 (±1)	
oskar (osk^{166}/osk^{166})		52 (±1) bis 28 (±1)	1
pumilio (pum^{680}/pum^{680})		50 (±2) bis 32 (±2)	2
tudor (tud^{WC}/tud^{WC})		53 (±2) bis 28 (±2)	3
vasa ($vas^{PD}/Df(2L)A72$)		53 (±2) bis 24 (±3)	3
staufen ($stau^{D3}/Df(2R)PC4$)		62 (±2) bis 28 (±2)	3
torso (tor^{WK}/tor^{HH})		55 (±1) bis 37 (±1)	3
trunk (trk^{HD}/trk^{PI})		54 (±1) bis 37 (±1)	3
bicoid			
($bcd^{E2}/Df(3R)LIN$)		69 (±1) bis 56 (±1)	4
($bcd^{2-13}/Df(3R)LIN$)		77 (±1) bis 53 (±1)	4
exuperantia (exu^{PJ}/exu^{QR})		59 (±1) bis 32 (±1)	3;5
swallow			
($swa^{14}/Df(1)JF5$)	18°	56 (±5) bis 28 (±3)	6;5
	29°	52 (±4) bis 31 (±3)	
oskar-bicoid			
($osk^{166}bcd^{E2}/osk^{166}bcd^{E2}$)		69 (±1) bis 32 (±1)	
hunchback			
($Df(3R)pXT27/Df(3R)pXT27$)		67 (±2) bis 41 (±1)	7;8
(hb^{6N}/hb^{6N})		64 (±2) bis 41 (±1)	
knirps (kni^{FC}/kni^{FC})		s Abb.10d	8;2
tailless (tll^{l}/tll^{l})		wie im Wildtyp	10
giant (gt^{YA}/gt^{YA})		"	11
runt (run^{YC}/run^{YC})		"	8
hairy (h^{IIP}/h^{IIP})		"	8
paired ($prd^{2.45}/prd^{2.45}$)		"	8
odd paired (opa^{IIP}/opa^{IIP})		"	9
sloppy paired (slp^{7L}/slp^{7L})		"	9
even skipped (eve^{R13}/eve^{R13})		"	8
odd skipped ($odd^{1.36}/odd^{1.36}$)		"	8
fushi tarazu ($ftz^{9\ O}/ftz^{9\ 0}$)		"	9
engrailed ($en^{I\ D}/en^{I\ D}$)		"	8

a) Die Zahlen geben die anterioren und posterioren Grenzen der *Kr* Proteindomäne in % EL an (0% posteriorer Pol). Es wurden je zehn mutante Embryonen (bzw. Embryonen mutanter Mütter) pro "Batch" ausgewertet (s. Material und Methoden); die Standardabweichung der Messungen ist jeweils in Klammern angegeben.

1 Lehmann und Nüsslein-Volhard (1986)
2 Lehmann (1985)
3 Schüpbach und Wieschaus (1986)
4 Frohnhöfer und Nüsslein-Volhard (1986)
5 Frohnhöfer und Nüsslein-Volhard (1987)
6 Stephenson und Mahowald (in Vorbereitung)
7 White und Lehmann (1986)
8 Nüsslein-Volhard und Wieschaus (1980)
9 Jürgens et al. (1984)
10 Petschek et al. (1987)
11 Strecker et al. (1986)

gene unabhängig ist. Demgegenüber ist die *Kr* Domäne in Mutanten der maternalen Segmentierungsgene verändert (s. ausführlich Kap. 2.3); offensichtlich wird also die Aktivität dieser Gene für eine normale *Kr* Expression benötigt (Tabelle 1).
Diese Befunde bestätigen zunächst das Konzept einer Hierarchie der Segmentierungsgene und die Vorstellung vom Ort der Gap Gene innerhalb dieser Hierarchie: *Kr* als Gap Gen ist offenbar den Paarregelgenen über-, den maternalen Genen dagegen untergeordnet.

Weniger einheitlich sind die Ergebnisse für diejenigen Gene, die *Kr* in der angenommenen Hierarchie gleichgeordnet sind, d.h. die übrigen Gap Gene. Sie seien im folgenden beschrieben.

2.2 Die *Kr* Proteindomäne in Gap Genmutanten

Das gemeinsame Merkmal der Phänotypen der Gap Genmutanten ist das Fehlen einer Gruppe von benachbarten Segmenten. Zur Klasse der Gap-Gene werden danach außer *Kr* noch *hunchback* (*hb*), *knirps* (*kni*), *tailless* (*tll*) und *giant* (*gt*) gezählt.

In homozygoten *hb* Embryonen sind Labrum und Thorax deletiert (C3, T1-3) (Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1986). Die *Kr* Proteindomäne in diesen amorphen *hb* Embryonen ist verbreitert und insgesamt etwas nach anterior vorgerückt (67-41 % EL) (s. Tabelle 1). Interessanterweise finden sich unter den Allelen, die einen extremen Phänotyp ausbilden (Klasse I), auch hypomorphe Allele. In homozygoten hb^{14F} und hb^{6N} Embryonen, die aufgrund von Antikörperfärbungen mit *hb* Antikörpern als hypomorph charakterisiert werden konnten (Tautz, pers. Mitteilung), ist die Verbrei-

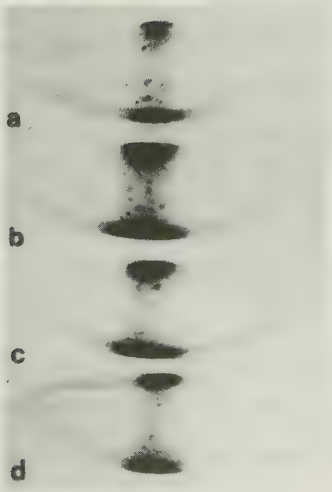


Abb. 10 *Kr* Proteinverteilung im Wildtyp und in gap Mutanten.

Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von Blastodermembryonen, die mit *Kr* Antikörper gefärbt wurden. (a) Wildtypembryo, (b) homozygoter *Df(3R)pxT27* Embryo (*hb* defizient), (c) homozygoter hb^{6N} Embryo, (d) homozygoter kni^{FC} Embryo.

terung der *Kr* Domäne nach anterior weniger ausgeprägt als in Embryonen, die für eine *hb* Defizienz homozygot sind (Abb. 10 b,c; Tabelle 1). Diese Befunde zeigen, daß eine Ausdehnung der *Kr* Expression nach anterior nicht für die Segmentierungsdefekte, die in *hb* Mutanten auftreten, verantwortlich ist.

Der extreme *kni* Phänotyp ist durch eine Deletion der Abdominalsegmente 1-7 charakterisiert, an deren Stelle ein Zähnchenfeld gebildet wird, das als Fusion mehrerer abdominaler Segmente zu interpretieren ist (Lehmann, 1985). In homozygoten *kni* Embryonen (es wurden alle Allele getestet, die einen extremen Phänotyp ausbilden, und zwei Defizienzen) ist die *Kr* Proteindomäne geringfügig (2-4 Zellen) gegenüber heterozygoten und Wildtypembryonen vergrößert (Abb. 10d).

tll und *gt* haben insofern einen Sonderstatus in der Gruppe der Gap Gene, als beide phänotypische Defekte in zwei Regionen des Segmentmusters aufweisen. *gt* Embryonen weisen Defekte im Kopf und in den Abdominalsegmenten 5-7 auf (Petschek et al., 1986); in *tll* Mutanten weist das Kopfskelett Störungen auf, posterior sind das Abdominalsegment 8 und das Telson eliminiert (Strecker et al., 1986). Weder in *tll* noch in *gt* mutanten Embryonen wurde eine signifikante Veränderung der *Kr* Proteindomäne beobachtet.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß innerhalb der Gap Genklasse offenbar nur *hb* (und *kni*) die *Kr* Expression im Blastoderm beeinflussen.

2.3 Die *Kr* Proteindomäne in maternalen Segmentierungsgenmutanten

Die maternalen Gene, die an der Ausbildung des antero-posterioren Segmentmusters beteiligt sind, lassen sich aufgrund ihrer jeweiligen phänotypischen Defekte in drei Gruppen zusammenfassen. Eine Gruppe der maternal aktiven Gene wird zur Ausbildung der abdominalen Region benötigt, eine zweite zur Etablierung anteriorer Strukturen und eine dritte zur Organisation terminaler Strukturen an beiden Enden des Embryos (Abb. 11, linke Spalte). (Im folgenden werden die Gene dieser drei Gruppen als "posteriore Organisatorgene", "anteriore Organisatorgene" und "terminale Organisatorgene" bezeichnet.) In erster Näherung kann davon ausgegangen werden, daß diese drei Gruppen von Genen voneinander unabhängig aktiv sind.

Vorab sei bemerkt, daß sich die Beschreibung mutanter Phänotypen nur auf die in dieser Arbeit verwendeten Allele bezieht.

2.3.1 Die *Kr* Proteindomäne in Mutanten posteriorer Organisatorgene

Embryonen, deren Mütter homozygot für *vasa* (*vas*), *oskar* (*osk*), *pumilio* (*pum*), *tudor* (*tud*) oder *staufen* (*stau*) sind, weisen Deletionen abdominaler Segmente auf (Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1986; Lehmann, 1985; Schüpbach und Wieschaus, 1986). (Sie werden im folgenden kurz als *vas*, *osk*, *pum*, *tud* bzw. *stau* Embryonen bezeichnet; entsprechendes gilt im weiteren für alle Embryonen, deren Mütter mutant für maternale Segmentierungsgene sind.)

Die stärksten Defekte im abdominalen Segmentmuster werden in *osk*, *vas*, *pum* und *stau* Mutanten beobachtet: Alle Abdominalsegmente sind bis auf

einige wenige Zähnchenbänder deletiert; an den normalen Thorax schließt sich das ebenfalls normale Telson an (Abb. 11). *tud* Embryonen zeigen demgegenüber einen variableren Phänotyp. 20-40 % der Embryonen schlüpfen und erscheinen normal; in defekten Embyronen bleiben das erste und das achte Abdominalsegment normal, während die dazwischenliegenden Segmente in unterschiedlichem Ausmaß von Deletionen und Fusionen betroffen sind. *stau* Mutanten weisen neben dem abdominalen Segmentierungsdefekt zusätzlich Deletionen im Kopfbereich auf.

Jede dieser fünf Mutanten zeigt unterschiedliche Veränderungen im *Kr* Proteinmuster gegenüber dem Wildtyp (Abb. 11; Tabelle 1); für die Untersuchung wurde jeweils das stärkste bekannte Allel verwendet, z.T. in trans zu einer die Mutation aufdeckenden Defizienz (s. Tabelle 1).

In *vas*, *osk* und *pum* ist die *Kr* Proteindomäne in unterschiedlicher Weise verändert, obwohl die Phänotypen einander sehr ähnlich sind. Sowohl in *vas* wie in *osk* liegt die anteriore Grenze der *Kr* Domäne fast an der normalen Position, die posteriore Grenze ist in beiden nach posterior verschoben, jedoch in *vas* stärker als in *osk*. Demgegenüber ist die *Kr* Proteindomäne in *pum* nur wenig vergrößert und insgesamt nach posterior verschoben.

In *tud* Embryonen ist die *Kr* Proteindomäne trotz der Variabilität des Phänotyps konstant; sie ist dabei nach Lage und Ausdehnung mit der in *osk* Embryonen identisch, obwohl der *tud* Phänotyp schwächer ist als der von *osk*.

Die auffälligste Veränderung des *Kr* Proteindomäne wurde in *stau* Embryonen beobachtet. Sowohl anteriore wie posteriore Grenze sind polwärts verschoben, die *Kr* Proteindomäne ist insgesamt doppelt so groß wie im Wildtyp (Abb. 11, Abb. 12b).

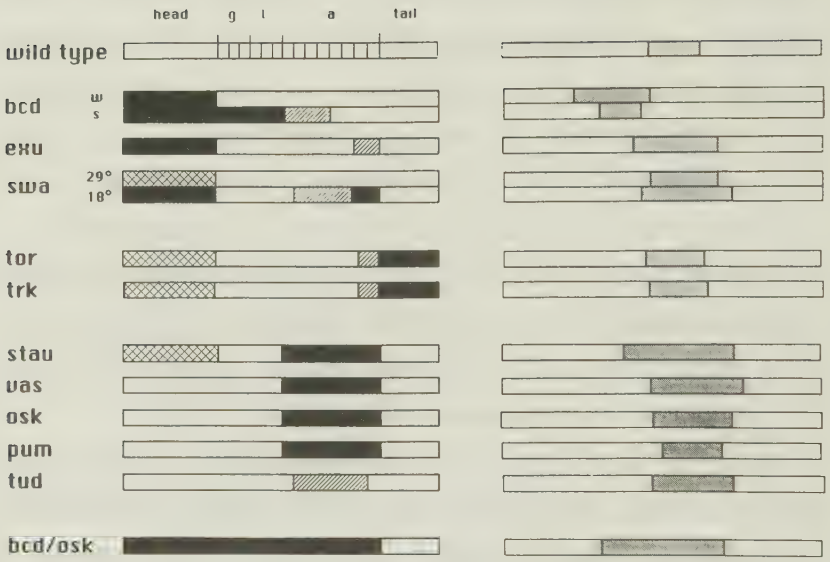


Abb. 11 Schematische Darstellung der Segmentierungsdefekte verschiedener maternaler Segmentierungsmutanten im Blastodermanlagenplan (linke Spalte) und der *Kr* Proteindomänen dieser Mutanten im Blastoderm (rechte Spalte).

Die erste Zeile stellt die Blastodermanlage des Wildtyps dar, mit Kopf (head), 3 Gnathal- (g), 3 Thorakal- (t), 8 Abdominalsegmenten (a) und dem "Schwanz" (tail) (linke Spalte); Lage und Ausdehnung der *Kr* Proteindomäne im Blastoderm des Wildtypembryos sind in der rechten Spalte eingetragen (grau schattiert). Die offenen Balken repräsentieren die Longitudinalachse des Embryos; anterior liegt links, posterior rechts. Veränderungen im Segmentmuster mutanter Embryonen (linke Spalte) sind in folgender Weise gekennzeichnet: Deletion (schwarz); schwere Störungen (doppelt schraffiert); variable Defekte (schraffiert). Die Daten sind der Tabelle 1 entnommen, in der auch der Genotyp der Mütter angegeben ist.

So sehr also die Veränderungen der *Kr* Proteindomäne in den Mutanten posteriorer Organisatorgene im Detail variieren, ihnen allen ist doch eine deutliche Vergrößerung der Domäne zum posterioren Pol hin gemeinsam.

2.3.2 Die *Kr* Proteindomäne in Mutanten der anterioren Organisatorgene

Den Mutanten der anterioren Organisatorgene sind Defekte im anterioren Kopfbereich gemeinsam; jedoch unterscheiden sie sich bezüglich der Bereiche des Segmentmusters, die zusätzlich von Störungen betroffen sind. Während in *bicoid* (*bcd*) der gesamte anteriore Bereich gestört sein kann, ist in *exuperantia* (*exu*) und *swallow* (*swa*) Embryonen der posteriore Abdominalbereich von Störungen betroffen. Wie jüngste Arbeiten von Frohnhöfer und Nüsslein-Volhard (1987) gezeigt haben, dienen das *exu* und das *swa* Genprodukt zur Lokalisation der *bcd*-Aktivität, die ihrerseits Morphogenqualität zu besitzen scheint.

In *bcd* Embryonen kann neben dem Kopf das gesamte anteriore Segmentmuster gestört sein (Frohnhöfer und Nüsslein-Volhard, 1986). In den stärksten Phänotypen der allelischen Serie sind Kopf und Thorax deletiert und durch eine spiegelbildliche Duplikation des posterioren Telsons, mitunter auch posteriorer Abdominalsegmente, ersetzt. Daneben weisen die anterioren Abdominalsegmente Deletionen und Fusionen auf. In den schwächsten Allelen findet sich nur ein anteriorer Kopfdefekt. Die beobachteten Defekte nehmen allerdings nicht mit zunehmender Allelstärke kontinuierlich von anterior nach posterior zu.
In Embryonen, die einen schwachen *bcd* Phänotyp ausbilden, ist die *Kr* Proteindomäne insgesamt stark nach anterior gerückt und deutlich

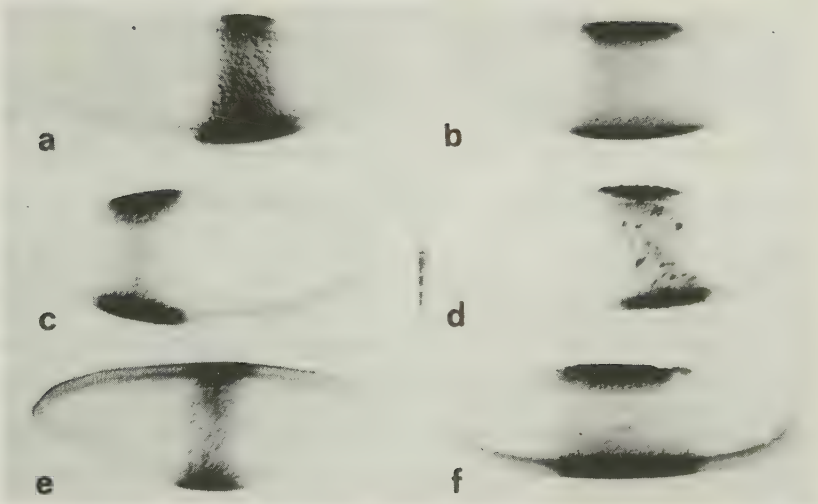


Abb. 12 Die *Kr* Proteindomäne in Embryonen maternaler Segmentierungsmutanten.

Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von Blastodermembryonen, die mit *Kr* Antikörper gefärbt wurden. (a) Embryo einer homozygoten osk^{166} Mutter, (b) Embryo einer $stau^{D3}/Df(3R)PC4$ Mutter, (c) Embryo einer $bcd^{2-13}/Df(3R)LIN$ Mutter, (d) Embryo einer $swa^{14}/Df(1)JF5$ Mutter, (e) Embryo einer tor^{WK}/tor^{HH} Mutter, (f) Embryo einer homozygot $osk^{166}bcd^{E2}$ doppelmutanten Mutter.

verbreitert. Demgegenüber ist in amorphen *bcd* Embryonen zwar die posteriore Grenze der *Kr* Domäne nach anterior verschoben, die Domäne ist aber nicht mehr verbreitert (Abb. 11, Abb. 12c).

exu und *swa* Embryonen weisen neben Kopfdefekten Fusionen und Deletionen im posterioren Abdomen auf (Schüpbach und Wieschaus, 1986; Stephenson und Mahowald, in Vorbereitung). In *exu* sind bei 10 % der Embryonen die Abdominalsegmente 7 und 8 fusioniert. *swa* Embryonen zeigen stärkere Defekte im posterioren Abdomen; die meisten Embryonen besitzen weniger als 6 abdominale Zähnchenbänder. Die Defekte in *swa* Mutanten sind außerordentlich temperatursensitiv und bei permissiver Temperatur sehr variabel.

Sowohl in *exu* wie auch in *swa* Embryonen ist die *Kr* Proteindomäne nach beiden Seiten verbreitert, und zwar stärker nach posterior als nach anterior. Die Verschiebung nach posterior ist in *swa* Embryonen (bei erheblicher Variabilität) im Mittel deutlich stärker als in *exu* Embryonen (Abb. 11, Abb. 12d (*swa*)). Dieses Ergebnis korrespondiert mit dem stärkeren Abdominaldefekt in *swa*.

2.3.3 Die *Kr* Proteindomäne in Mutanten terminaler Organisatorgene

Für die Ausbildung terminaler Strukturen im Embryo ist eine Gruppe von Genen verantwortlich: *torso* (*tor*), *trunk* (*trk*), *torsolike* (*tsl*), mit Einschränkung *fs(1)Nasrat* (*N*) und *fs(1)pole hole* (*ph*). Der mutante Phänotyp dieser Gene ist durch das Fehlen des Telsons und des 8. Abdominalsegments am posterioren Ende charakterisiert. Anterior fehlt das Labrum, und insgesamt ist die anteriore Kopfregion reduziert (Schüpbach und Wieschaus, 1986; Frohnhöfer, 1987). Die korrespondierende Wildtypaktivität scheint also für die Ausbildung sowohl anteriorer wie posteriorer Strukturen zugleich verantwortlich zu sein. Es wurden *tor*, *trk* und *tsl* Embryonen untersucht.
In *tor* und *trk* Embryonen ist die *Kr* Proteindomäne nur geringfügig vergrößert (Abb. 11, Abb. 12e).

Insgesamt ergibt sich, daß die *Kr* Proteindomäne sowohl von *bcd* wie auch von den posterioren Organisatorgenen kontrolliert wird. Die ausgeübte Kontrolle ist negativ, da eine Mutation dieser Gene zu einer Ausdehnung der *Kr* Porteindomäne führt (dies gilt im Fall von *bcd* nur für hypomorphe Allele; in amorphen *bcd* Allelen ist die *Kr* Proteindomäne im wesentlichen nicht verbreitert, sondern nur nach anterior verschoben; zur Erklärung dieses Befunds s. 2.5). Eine positive Kontrolle durch anteriore und posteriore Organisatorgene ist auszuschließen, da selbst unter jeweils amorphen Bedingungen noch *Kr* Proteinexpression vorhanden ist. Dagegen scheinen solche Gene, die für die Organisation terminaler Strukturen verantwortlich sind, die Etablierung der *Kr* Proteindomäne nicht zu beeinflussen.

2.3.4 Die *Kr* Proteindomäne in *osk bcd* Embryonen

In Embryonen, deren Mütter homozygot für *osk* und *bcd* sind, fehlen die Genprodukte, die an der Organisation des anterioren und des posterioren Musters entscheidend beteiligt sind. In diesen Embryonen addieren sich die phänotypischen Defekte der Einzelmutanten; sie bilden überhaupt kein Segmentmuster aus; das posteriore Telson ist anterior dupliziert (wie in *bcd*$^-$ Embryonen), die Kutikula dazwischen ist nackt (Frohnhöfer 1987). In diesen Embryonen ist nun auch die *Kr* Domäne stark nach beiden Seiten vergrößert; sie reicht von 30 bis 70 % EL und umfaßt damit fast vollständig denjenigen Bereich der Blastodermanlage, in dem im Wildtyp später das Segmentmuster ausgebildet wird (Abb. 11, Abb. 12f) (Lohs-Schardin et al., 1979).

osk bcd Embryonen bilden also trotz Expression von *Kr* im gesamten Segmentierungsbereich keinerlei Segmentmuster aus; dies zeigt, daß *Kr* per se nicht imstande ist, Segmentierung zu instruieren, und daß es selbst innerhalb seiner eigenen Expressionsdomäne hierzu offensichtlich der Mitwirkung weiterer Gene bedarf.

2.4 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb* und *ftz* in Mutanten der anterioren, posterioren und terminalen Organisatorgene

Mit der Aussage, daß *Kr* durch anteriore und posteriore Organisatorgene negativ kontrolliert wird, sind die bisher beschriebenen Befunde noch nicht vollständig erklärt. Eine Reihe von Fragen bleibt dabei offen; insbesondere ist nicht beantwortet, warum es in *osk bcd* Doppelmutanten nicht zu einer ubiquitären *Kr* Expression kommt, weshalb eine Verkleinerung der *Kr* Proteindomäne in starken gegenüber schwachen bcd Allelen zu beob-

achten ist, und weshalb sich die posteriore Grenze der *Kr* Domäne in *bcd* Mutanten verschiebt, während umgekehrt die anteriore Grenze der *Kr* Proteindomäne in Mutanten der posterioren Organisatorgene im wesentlichen unverändert bleibt. Um diese Fragen klären zu können, ist es erforderlich, genauer zu verstehen, in welcher Weise die maternalen Gene auf die *Kr* Proteinexpression Einfluß nehmen und wie die maternalen Genprodukte bei der Etablierung der antero-posterioren "Positionsinformation" zusammenwirken.

Die damit bezeichnete umfassendere Problemstellung machte es notwendig, die Verteilung von *Kr* Protein mit dem Muster der *hunchback* (*hb*) und *fushi tarazu* (*ftz*) Proteinexpression zu korrelieren. Es wurde damit ein weiteres Gap Gen, und zwar dasjenige, dessen Expressionsdomäne anterior an die von *Kr* anschließt, in die Analyse mit einbezogen, sowie ein Paarregelgen, dessen Expressionsmuster Veränderungen im Blastodermanlagenplan festzustellen erlaubt. Die für diese Analyse benötigten Antikörper wurden mir dankenswerterweise von Dr. D. Tautz (Anti-*hb* Protein-Antikörpern) und Dr. S. Carroll (Anti-*ftz* Protein-Antikörper) zur Verfügung gestellt.

Mit Anti-*hb*-Antikörpern werden im Wildtypembryo im Blastoderm zwei Expressionsdomänen sichtbar: Die anteriore Domäne reicht - im mittleren Blastoderm - vom anterioren Pol bis ungefähr 51 % EL, die posteriore ungefähr von 10 bis 20 % (Tautz et al., 1987). Das Paarregelgen *ftz* wird im Blastoderm in sieben Streifen exprimiert, die die Anlagen der geradzahligen Parasegmente markieren (PS2: pMaxille/aLabium; PS4: pT1/aT2; PS6: pT3/aA1; PS8: pA2/aA3; PS10: pA4/aA5; PS12: pA6/aA7; PS14: pA8/aA9) (Carroll und Scott, 1985).

Während des mittleren Blastoderms sind die Expressionsmuster von *Kr*, *hb* und *ftz* Protein im Wildtyp nun in folgender Weise aufeinander bezogen: Die anteriore Grenze der *Kr* Proteindomäne fällt mit der anterioren Grenze des 2. *ftz* Streifens zusammen (PS4) und die posteriore Grenze reicht an die anteriore Grenze des 4. *ftz* Streifens (PS8) heran; der dritte *ftz* Streifen liegt mithin vollständig in der *Kr* Domäne. Die posteriore Grenze der vorderen *hb* Domäne liegt im zweiten *ftz* Streifen (s. Abb. 13).

2.4.1 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb* und *ftz* in Mutanten der anterioren und posterioren Organisatorgene

Die Betrachtung der Verteilung von *Kr*, *hb* und *ftz* Protein in schwächeren *bcd* Allelen verschiedener Stärke zeigt eine korrelierte Veränderung des Expressionsmusters dieser drei Gene (s. Abb. 13): Je weiter sich die *Kr* Proteindomäne nach anterior ausdehnt, desto stärker ist die *hb* Proteindomäne nach vorn zurückgezogen. Das *ftz* Proteinmuster ist nach anterior ausgedehnt, in einer solchen Weise, daß die Lage der Proteindomänen relativ zueinander erhalten bleibt: Der 2. *ftz* Streifen (von anterior gerechnet) liegt nach wie vor im Grenzbereich von *Kr* und *hb*.
Es zeigt sich also, daß es mit zunehmendem Verlust an funktionaler *bcd* - Aktivität (die Veränderungen mögen quantitativer oder qualitativer Natur sein) zu einer Verschiebung des Anlagenplanes nach anterior kommt; die Verschiebung des Anlagenplans ist dabei an der Veränderung des *ftz* Proteinmusters abzulesen.
Demgegenüber kommt es beim Fehlen von posterioren Organisatorgenen wie z.B. *osk* zu keiner Verschiebung im Anlagenplan: Die posterioren *ftz* Streifen 3-6 fusionieren zwar, aber die ersten beiden *ftz* Streifen (die die Segmentanlagen von pT1/aT2 und pT3/aA1 markieren) und der letzte (der

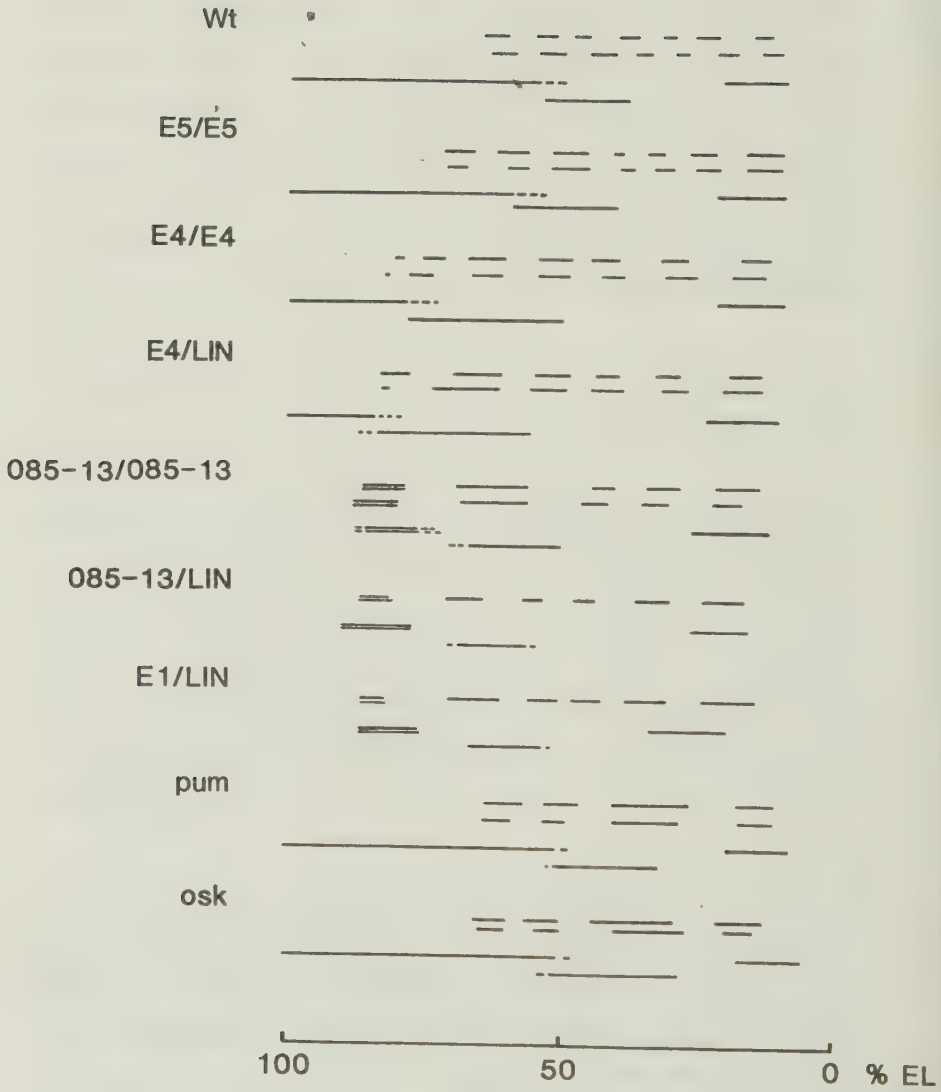

Wt
E5/E5
E4/E4
E4/LIN
085-13/085-13
085-13/LIN
E1/LIN
pum
osk
100
50
0
% EL

Abb. 13 Schematische Darstellung der Proteinverteilungen von *ftz*, *hb* und *Kr* im Wildtyp sowie in *bcd*, *pum* und *osk* Embryonen

Embryonen von Wildtyp, bzw. *bcd* (Allelkombinationen: *E5/E5*, *E4/E4*, *E4/LIN*, *085-13/085-13*, *085-13/LIN*, *E1/LIN*), *pum* (*pum680/pum680*) und *osk* (*osk166/osk166*) mutanten Müttern wurden jeweils mit *Kr*, *hb* und *ftz* Antikörpern einzeln wie auch in Kombination (*Kr/hb* bzw. *hb/ftz*) gefärbt (s. Material und Methoden 3.7.2). Von den gefärbten Embryonen wurden *camera lucida* Zeichnungen angefertigt und wie unter xxx beschrieben ausgewertet. In der Regel wurden für diese Auswertungen wegen der größeren Meßgenauigkeit einzelgefärbte Embryonen verwendet; die Doppelfärbungen dienten der Bestätigung der aus Einzelfärbungen erhaltenen Daten. In der schematischen Darstellung sind die Proteinverteilungen für die jeweiligen Allel(kombination)e(n) anhand von typischen Einzelfällen wiedergegeben; insgesamt soll dabei ein qualitatives Bild vermittelt werden. Für jede(s) Allel(kombination) sind (von oben nach unten) zwei typische *ftz* Proteinmuster (für *bcd* $^{085\text{-}13}/_{LIN}$ und *bcd* $^{E1}/_{LIN}$ nur jeweils eine), die *hb* Proteindomänen sowie die *Kr* Proteindomäne durch Striche angegeben. Z.T sind ungefähre Schwankungsbreiten der Proteindomänen durch unterbrochene Linien angegeben. Verdoppelte Linien bezeichnen die anteriore Duplikation posteriorer Proteindomänen (von *ftz* und *hb*).

In schwachen *bcd* Allel(kombination)en (*E5/E5*, *E4/E4* und *E4/LIN*) kommt es im wesentlichen zu einer Verschiebung aller Proteindomänengrenzen nach anterior. Die Proteindomänengrenzen von *Kr* und *hb* schließen dabei immer aneinander an, meist kommt es dabei zu einer geringfügigen Überlappung der Proteindomänen. Die Verschiebungen der Proteindomänengrenzen nach anterior von *hb*, *Kr* und *ftz* sind miteinander korreliert.

In starken *bcd* Allel(kombination)en (*085-13/085-13*, *085-13/LIN*, *E1/LIN*), die durch den vollständigen Verlust des anterioren Musters (Kopf und Thorax) und durch eine anteriore Duplikation des posterioren Telsons charakterisiert sind, ist das Proteinmuster aller drei betrachteten Gene stark verändert. Die *Kr* Proteindomäne ist zwar gegenüber dem Wildtyp nach anterior verschoben, aber nicht mehr verbreitert, wie dies in schwachen *bcd* Allelen zu beobachten ist. Die anteriore *hb* Domäne ist verschwunden; an ihre Stelle ist eine Duplikation der posterioren Proteindomäne getreten. Der Segmentanlagenplan ist schwer gestört; die beiden anterioren *ftz* Streifen fehlen, und es kommt zu einer anterioren Duplikation des 7. *ftz* Streifens (daß es sich dabei tatsächlich um den 7. *ftz* Streifen handelt, kann aufgrund seiner Position relativ zum anterior duplizierten Telson geschlossen werden).

In Mutanten der posterioren Organisatorgene ist im wesentlichen nur die *Kr* Proteindomäne nach posterior ausgeweitet. Es kommt zu keiner Verschiebung des Anlagenplans; allerdings sind im *ftz* Proteinmuster nur die Streifen 1,2 und 7 aufgelöst, die Streifen 3-6 sind durch eine einzige breite Proteindomäne ersetzt.

die Segmentanlage von pA8/aA9 markiert) bleiben in ihrer Lage und Ausdehnung unverändert. Die *hb* Proteindomäne dehnt sich schwach nach posterior aus. Die *Kr* Proteindomäne ist sehr stark nach posterior ausgeweitet, die anteriore Domänengrenze ist aber nur wenig nach posterior verschoben.

In allen starken *bcd* Allelen, die phänotypisch durch eine anteriore Duplikation des Telsons und durch den vollständigen Verlust des Thorax gekennzeichnet sind, ist das Muster der drei betrachteten Gene stark verändert: Die anteriore *hb* Proteindomäne ist verschwunden; an ihre Stelle ist eine Duplikation der posterioren Domäne getreten. Die *Kr* Proteindomäne hat sich zu einem deutlich schmaleren Streifen zusammengezogen, und das *ftz* Muster weist nur noch 5-6 Streifen auf (meist ist der zweite Streifen (von anterior gerechnet) in zwei Streifen aufgespalten, daher dann 6 Streifen) (Abb. 13).
Diese komplexen Veränderungen in der Expression der betrachteten Gene lassen sich in folgender Weise verstehen: Die anteriore *hb* Domäne wird nicht mehr ausgebildet, da die positive Kontrolle durch *bcd* wegfällt. Da nicht einfach die anterioren Strukturen (Kopf und Thorax) fehlen, sondern an ihrer Stelle posterior-terminale Strukturen etabliert werden, muß eine normale Funktion von *bcd* die Unterdrückung der Gene sein, die die Ausbildung dieser posterior-terminalen Strukturen bewirken. Das vollständige Fehlen von *bcd* hat also zur Konsequenz, daß diese Repression wegfällt und sich die Gene, die die Ausbildung des Telson instruieren, etablieren können. Dies führt zur Zurückdrängung der *Kr* Expression (die *Kr* Proteindomäne ist beträchtlich schmaler) und zur Etablierung einer zweiten posterioren *hb* Proteindomäne in anteriorer Position.

Für diese Interpretation ist vorausgesetzt, daß die maternalen Gene, die für die Ausbildung des Telson verantwortlich sind, einen negativen Einfluß auf die *Kr* Expression besitzen. Wenn dem so wäre, würde dies auch das Proteinmuster von *Kr* in den Mutanten der posterioren Organisatorgene erklären. Die *Kr* Proteindomäne reicht in diesen Mutanten weit nach posterior, erreicht aber nie die Polregion (0-30 % EL). Aus diesem Bereich des Blastodermembryos geht nun aber im Normalfall - wie auch in den Mutanten posteriorer Organisatorgene - das Telson hervor. Der Zusammenhang zwischen Telson-instruierenden Genen und der *Kr* Expression wird im folgenden betrachtet (s. 2.4.2).

2.4.2 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb* und *ftz* in Mutanten der terminalen Organisatorgene

Zunächst sei genauer auf die Konsequenzen eingegangen, die das Fehlen von terminalen Organisatorgenen auf die Expression von *Kr*, *hb* und *ftz* hat:
Wie in 2.3.3 gezeigt wurde, ist die *Kr* Proteindomäne in *tor* und *trk* Embryonen nicht signifikant verändert. Demgegenüber zeigt das *hb* Proteinmuster deutliche Veränderungen: Die posteriore *hb* Proteindomäne wird nicht ausgebildet (Abb. 14a); dies zeigt (wie oben bereits vermutet wurde), daß die Ausbildung der posterioren Proteindomäne von *hb* unter dem Einfluß der Telson-instruierenden Gene erfolgt. Am *ftz* Proteinmuster läßt sich die Reaktion des antero-posterioren Systems auf das Fehlen der terminalen Organisatorgene ablesen: Es werden nur noch 6 *ftz* Streifen ausgebildet, wobei der siebente Streifen (PS14) fehlt. Während die ersten fünf Streifen (PS 2,4,6,8,10) nur schwach nach anterior verschoben sind, ist der sechste (PS12) ganz zum Pol gerückt (Abb. 14b).

Abb. 14 Proteinverteilung von *hb* und *ftz* in *tor* Embryonen.

Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von Blastodermembryonen, die mit *hb* (a) bzw. *ftz* (b) Antikörpern gefärbt wurden; die Embryonen stammen von tor^{PM}/tor^{HH} Müttern.

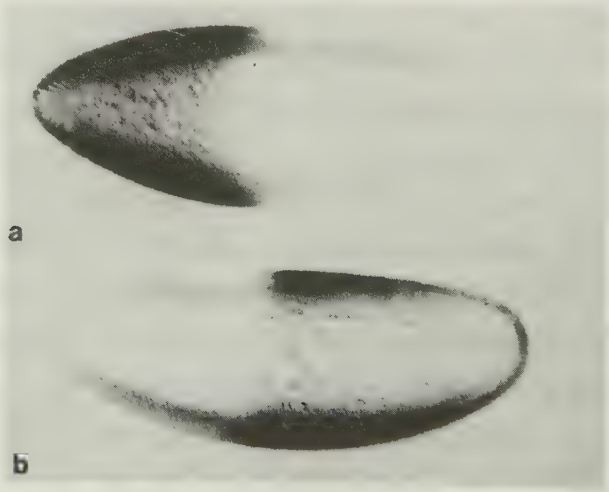


Abb. 15 Proteinverteilung von *Kr* in *bcd tsl* und *osk tsl* Embryonen.

Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von Blastodermembryonen, die mit *Kr* Antikörper gefärbt wurden; (a) Embryo einer homozygot $bcd^{E1}\ tsl^{085}$ doppelmutanten Mutter, (b) Embryo einer homozygot $osk^{166}\ tsl^{691}$ doppelmutanten Mutter.

Das alleinige Entfernen der terminalen Organisatorgene hat, wie zu sehen war, für die Expression von *Kr* keine besonderen Folgen (Abb. 12e). Ist dagegen bereits ein posteriores Organisatorgen oder *bcd* außer Funktion, wirkt sich das zusätzliche Fehlen terminaler Organisatorgene auf die Expression von *Kr* aus: Während in *osk* Embryonen die *Kr* Proteindomäne bis ungefähr 30% EL nach posterior ausgedehnt ist, erstreckt sie sich in *osk tsl* Embryonen (Phänotyp: Labrum, Abdomen und Telson fehlen (Frohnhöfer, 1987)) bis an den posterioren Pol (Abb. 15b). In analoger Weise verändert sich die Proteindomäne von *Kr* in *bcd tsl* Embryonen gegenüber *bcd* Embryonen (*bcd tsl* Embryonen zeigen den *bcd* Phänotyp, darüberhinaus fehlen aber das posteriore und das anterior duplizierte Telson (Frohnhöfer, 1987)). In *bcd* Embryonen reicht die *Kr* Proteindomäne bis ungefähr 70% EL, in *bcd*$^{-}$ *tsl* Embryonen dagegen bis an den Vorderpol (Abb. 15a).

Die terminalen Organisatorgene üben also durchaus einen reprimierenden Einfluß auf die *Kr* Expression aus; dieser Effekt bleibt jedoch in den Einzelmutanten (*tor*, *trk* und *tsl*) durch den ebenfalls negativen Einfluß, den anteriore und posteriore Organisatorgene auf *Kr* ausüben, verborgen. Oder anders ausgedrückt: In den terminalen Regionen des Embryo liegt eine doppelte negative Kontrolle auf die *Kr* Expression vor. Für die posteriore Situation läßt sich diese einfach beschreiben: Die posterioren (abdominalen) Organisatorgene reprimieren *Kr* im gesamten posterioren Bereich und die terminalen Organisatorgene zusätzlich im Bereich von 0-30% EL. Für die anteriore Region läßt sich ein solcher Schluß nicht ohne weiteres ziehen, da es in amorphen *bcd* Embryonen ja nicht nur zu einer Deletion der anterioren Strukturen, sondern darüberhinaus zu einer Duplikation des Telsons kommt. Die Untersuchung zeigt, daß sich diese anterior duplizierte Struktur in Bezug auf die Repression von *Kr* genau so verhält wie die

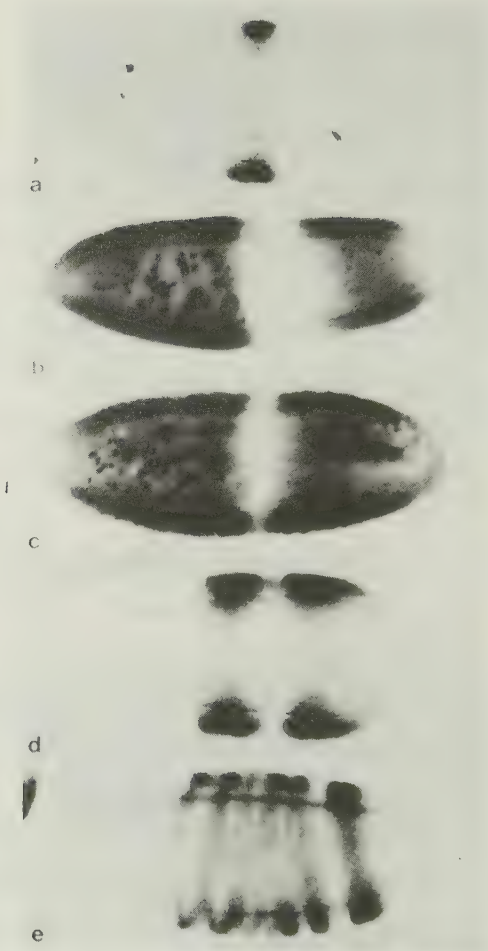


Abb. 16 Proteinverteilung von *Kr*, *hb* und *ftz* in *RL3* Mutanten.

Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von Blastodermembryonen, die mit *Kr* (a), *hb* (b, c) bzw *ftz* (d,e) Antikörpern gefärbt wurden; Embryonen homozygoter tor^{RL3} Mütter.

posteriore; daher ist verständlich, daß sich die zusätzliche Entfernung von *tsl* in derselben Weise auswirkt wie in *osk tsl* Embryonen; es kommt nämlich zu einer Derepression der *Kr* Expression, so daß sich die *Kr* Proteindomäne bis zum (anterioren) Pol ausdehnt. Damit ist aber noch nicht geklärt, welche Verhältnisse in der anterioren Region im Normalfall vorliegen, d.h. dann, wenn die anteriore Situation nicht durch das Auftreten posteriorer Strukturen modifiziert ist.

Ein weiterer Hinweis auf den negativen Einfluß, den die terminalen Organisatorgene auf die Expression von *Kr* ausüben, ergab sich durch die Untersuchung einer Reihe von Allelen des *tor* Locus, in denen es zu einer ektopischen Lokalisation von tor^+ Aktivität kommt (Klingler, pers. Mitteilung). *RL3* ist ein stark temperatursensitives Allel, das homozygot einen Phänotyp erzeugt, der dem *tor* Phänotyp entgegengesetzt ist: Bei 29° C kommt es zum Ausfall aller nicht-terminalen Kutikulastrukturen; am Hinterende bleibt nur das Telson erhalten, während am Vorderende lediglich das Stomodäum ausgebildet wird. Bei Raumtemperatur ist der Phänotyp sehr stark abgeschwächt; in variablem Umfang kommt es zur Eliminierung abdominaler und thorakaler Segmente. Bei 18° C schließlich sind die Embryonen weitgehend normal. Färbungen mit *ftz* Antikörper zeigen auf der Ebene der Segmentanlagen, welche Veränderungen mit zunehmender Ausprägung des Phänotyps zu beobachten sind. Zunächst treten Musterunregelmäßigkeiten wie Fusion von Streifen und Verschmälerung und Verschwinden einzelner Streifen insbesondere im anterioren und mittleren Bereich des *ftz* Proteinmusters auf (Abb. 16e), dann aber schwere Störungen des Musters, die zum Verschwinden fast aller ftz Streifen führen (Abb. 16d).

Die *Kr* Expression in *RL3* Embryonen ist bereits bei 18° C sehr stark beeinträchtigt: Die meisten Embryonen zeigen eine deutlich schmalere *Kr* Proteindomäne (Abb. 16a); bei Raumtemperatur ist keine *Kr* Färbung mehr sichtbar.

Transplantationsexperimente haben gezeigt, daß in *RL3* Embryonen tor^+ Aktivität nicht wie im Wildtyp in den terminalen Regionen akkumuliert, sondern über den gesamten Eibereich verteilt ist (Klingler, pers. Mitteilung). Das Verschwinden der *Kr* Proteindomäne in diesen Mutanten läßt sich somit als Folge einer Repression durch ektopisch lokalisiertes *tor* Produkt verstehen. Da die schwächsten Phänotypen von *RL3 Kr* Allelen gleichen und erst bei permissiver Temperatur schwerere Störungen im Kutikulamuster auftreten, darf man annehmen, daß in erster Linie *Kr* auf die anomale Verteilung von tor^+-Aktivität reagiert.

Die *hb* Expression ist im Gegensatz zu *Kr* in *RL3* Embryonen nicht beeinträchtigt, im Gegenteil, die beiden *hb* Proteindomänen dehnen sich zur Mitte des Embryos hin aus, in Extremfällen fusionieren sie nahezu (Abb. 16b,c).

2.5 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb* und *ftz* in *exu* Embryonen und in doppelmutanten Kombinationen mit *exu*

Für die bisherige Untersuchung ist die Frage leitend gewesen, welchen Einfluß die verschiedenen maternalen Gene auf die Expression von *Kr* (und *hb*) ausüben. Während für *Kr* eine negative Regulation durch Gene alle drei Gruppen von maternalen Segmentierungsgenen gezeigt werden konnte, unterliegt die anteriore *hb* Expression (im Blastoderm) einer positiven Kontrolle durch das anteriore Organisatorgen *bcd*, die posteriore vermutlich ebenfalls einer positiven Kontrolle durch terminale Organisatorgene.

Die im folgenden betrachteten Ergebnisse geben nun - allerdings nur indirekt - einen gewissen Aufschluß über die Funktionsweise der Gap Gene *Kr* und *hb* im Segmentierungsprozeß.

2.5.1 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb* und *ftz* in *exu* Embryonen

Der Phänotyp von *exu* Embryonen ist durch starke Kopfdefekte charakterisiert (s. 2.3.2). In der Gastrulation ist die Kopffalte nach vorn verschoben; zusätzlich wird anterior der hintere Mitteldarm dupliziert, und später sind in den meisten Embryonen Malpighigefäße am Vorderende sichtbar (Schüpbach und Wieschaus, 1986; Frohnhöfer,1987). In geringer Häufigkeit finden sich im posterioren Abdomen Segmentierungsstörungen. Dieser Phänotyp kommt nun vermutlich dadurch zustande, daß das *bcd* Genprodukt nicht in ausreichender Menge im Ei vorhanden ist, und daß es insbesondere nicht in gradiierter Form vorliegt, sondern gleichmäßig in der vorderen Hälfte des Eis verteilt ist und sogar weiter als im Wildtyp nach posterior reicht; *exu* dient also offenbar der Lokalisation der *bcd*-Aktivität (Frohnhöfer und Nüsslein-Volhard, 1987). Das Fehlen von *exu* wirkt sich nun in folgender Weise auf die Verteilung von *hb*, *Kr* und *ftz* Protein aus (Abb. 17): Die vordere *hb* Proteindomäne ist etwas nach posterior ausgedehnt; die Konzentration an *hb* Protein scheint dabei nicht geringer zu sein als im Wildtyp (Tautz, pers. Mitteilung). Die geringere Konzentration an *bcd* Genprodukt schlägt sich offensichtlich nicht in einer Reduktion der Konzentration von *hb* Produkt nieder; jedoch folgt die räumliche Verteilung im wesentlichen der Verteilung von *bcd*.

Die *Kr* Proteindomäne (s. 2.3.2) ist sowohl in anteriore wie in posteriore Richtung verbreitert; somit überlappen die Proteindomänen von *Kr* und *hb* deutlich. Aus den Veränderungen der *Kr* Proteindomäne läßt sich schließen,

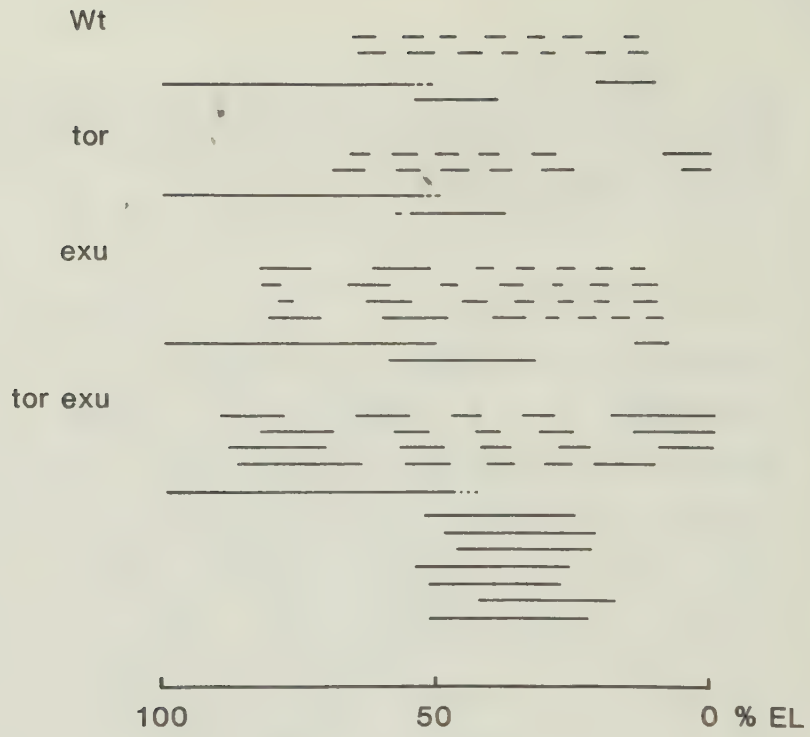


Abb. 17 Schematische Darstellung der Proteinverteilung von *ftz*, *hb* und *Kr* in Wildtyp-, *tor*, *exu* und *tor exu* Embryonen

tor, *exu* und *tor exu* Embryonen (Genotypen der Mütter tor^{PM}/tor^{HH}, exu^{PJ}/exu^{QR} und $tor^{WK}\ exu^{PJ}$ / $tor^{WK}\ exu^{PJ}$) wurden mit *ftz*, *Kr* und *hb* Antikörpern gefärbt. (Zur Datenerhebung s. Legende zur Abbildung 13)
In *tor* Embryonen ist die *Kr* Proteindomäne nicht signifikant verändert, die posteriore *hb* Proteindomäne fehlt, ebenso der 7. *ftz* Streifen. Der 6. *ftz* Streifen ist an den posterioren Pol gerückt.
In exu Embryonen ist die *Kr* Proteindomäne verbreitert und zwar etwas stärker nach posterior als nach anterior; anterior reicht die *Kr* Domäne stärker in die anteriore *hb* Domäne hinein. Der posteriore Teil des *ftz* Musters (Streifen 3-7) ist komprimiert.
In *tor exu* Embryonen ist die *Kr* Proteindomäne stark nach posterior ausgedehnt (stärker als in exu Embryonen); die Domänengrenzen unterliegen allerdings starken individuellen Unterschieden. Die *hb* Proteindomäne ist schwach nach posterior ausgedehnt. Das *ftz* Proteinmuster ist stark verändert: Der 6. *ftz* Streifen fehlt; das Restmuster (Streifen 1-5) ist über die gesamte embryonale Anlage ausgebreitet.

Derepression der *Kr* Expression führt. Daß darüberhinaus die *Kr* Domäne auch nach posterior erweitert ist, könnte eine mittelbare Folge der stärker nach posterior ausgedehnten *bcd*-Aktivität sein.

Was das *ftz* Muster anbetrifft, so sind die ersten beiden *ftz*-Streifen nach anterior gerückt und verbreitert, während die Streifen 3-7 etwas nach posterior gerückt und komprimiert sind. Der zweite *ftz*-Streifen liegt deutlich auch innerhalb der *hb* Proteindomäne, der vierte deutlich innerhalb der *Kr* Proteindomäne. Das *ftz* Muster steht also in anderer räumlicher Relation zu den Grenzen der Proteindomänen von *hb* und *Kr* als dies im Wildtyp der Fall ist; das bedeutet, daß durch die Domänengrenzen der Gap Gene kein festes Raster für die *ftz* Expression vorgegeben ist.

2.5.2 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb* und *ftz* in *tor exu* Embryonen

In *tor exu* Embryonen kommt es im vorderen Embryo zur Elimination der gesamten Kopfregion, so daß die Kutikula anterior mit T1 beginnt; posterior werden nur noch 6 Abdominalsegmente gebildet (Schüpbach und Wieschaus, 1986). Im Blastoderm ist das *ftz* Proteinmuster über die gesamte Anlage ausgebreitet, doch umfaßt es nur noch 5 Streifen; außer dem siebten Streifen (wie in *tor* Embryonen (s. 2.4.2)) fehlt zusätzlich noch der sechste (PS10: pA6/aA7) (Abb. 17). Das Muster besitzt, was die Breite und exakte Lokalisation der Streifen anbelangt, eine gewisse Variabilität. Das *ftz* Proteinmuster in der Doppelmutante unterscheidet sich somit erheblich von dem der Einzelmutanten: Durch die Wegnahme von *tor*-Aktivität vermag sich das Muster sowohl nach anterior wie nach posterior auszubreiten, der Effekt führt posterior sogar zum Verlust eines weiteren Streifens. Die *hb* Proteindomäne ist etwas nach posterior ausgedehnt, die *Kr* Proteindomäne zeigt eine deutliche Verbreiterung nach posterior mit der Tendenz einer Verschiebung auch der anterioren Domänengrenze zu stärker posterioren Positionswerten. Wie in *exu* Embryonen liegt der zweite *ftz* Streifen vollständig innerhalb der *hb* Domäne; aufgrund der Variabilität der *Kr* Domänengrenzen kann die relative Position zur anterioren Grenze des 2. *ftz* Streifens nicht exakt angegeben werden; jedenfalls liegt der 2. *ftz* Streifen partiell außerhalb der *Kr* Domäne (Abb. 17).

2.5.3 Die Proteindomänen von *Kr*, *hb* und *ftz* in *stau exu* Embryonen

Die Kombination *stau exu* produziert ein Spektrum verschiedener Phänotypen (Schüpbach und Wieschaus, 1986): In den allermeisten Fällen fehlen anterior Kopf- und Kieferstrukturen, an deren Stelle werden vor dem Prothorax Analplatten und Tufts ausgebildet, also terminale Strukturen. Das posteriore Muster ist variabler. In schwächeren Phänotypen folgt dem Prothorax ein normaler Meso- und Metathorax und eine Anzahl von Abdominalsegmenten. In starken Phänotypen kommt es anterior zu einer spiegelbildlichen Duplikation des Telsons; dem Pro- und Mesothorax normaler Orientierung folgt eine spiegelbildliche Duplikation von Meso- und Prothorax; am Hinterende liegt ein normales Telson.

Das *ftz* Proteinmuster zeigt eine entsprechende Variabilität. In schwächer gestörten Mustern kommt es zu einer Verschiebung der Streifen 3-7 nach posterior, während die ersten beiden Streifen nach anterior verschoben sind. Dabei ist der erste Streifen oft sehr schmal und schwach ausgebildet, der zweite dagegen sehr stark verbreitert (Abb. 18a). In stärker gestörten Embryonen ist zwar noch eine gewisse Polarität im Muster zu erkennen, die Zahl der *ftz* Streifen ist jedoch deutlich vermindert, und die Streifen verlieren ihre scharfen Grenzen. In einigen Fällen hat das Muster nahezu symmetrische Gestalt, dabei findet sich am anterioren wie am posterioren Pol je ein diffuser Streifen, in der zentralen Region liegt eine breite *ftz* Domäne (Abb. 18b).

Kr und *hb* zeigen eine Vergrößerung ihrer Proteindomänen, mit der Tendenz, das ganze Ei auszufüllen (*hb* Abb. 18c,d; *Kr* Abb. 18e,f); ihre Domänen überschneiden sich also deutlich; ferner zeigen sie keine scharfe Grenzen. Die Proteinkonzentration innerhalb der Domänen variiert deutlich; dabei scheint auch die Lage der Konzentrationsmaxima variabel zu sein.

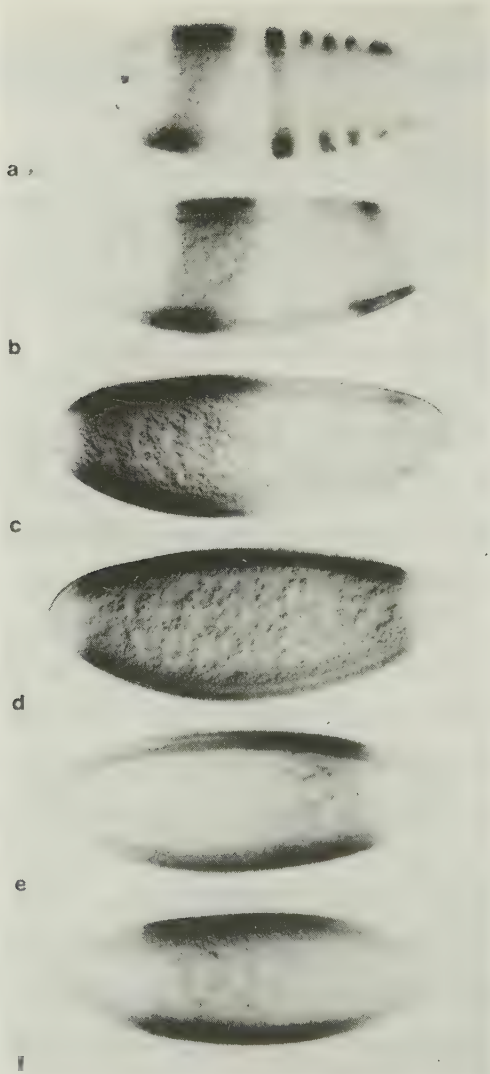


Abb. 18 Proteinverteilung von *ftz*, *hb* und *Kr* in *stau exu* Embryonen.

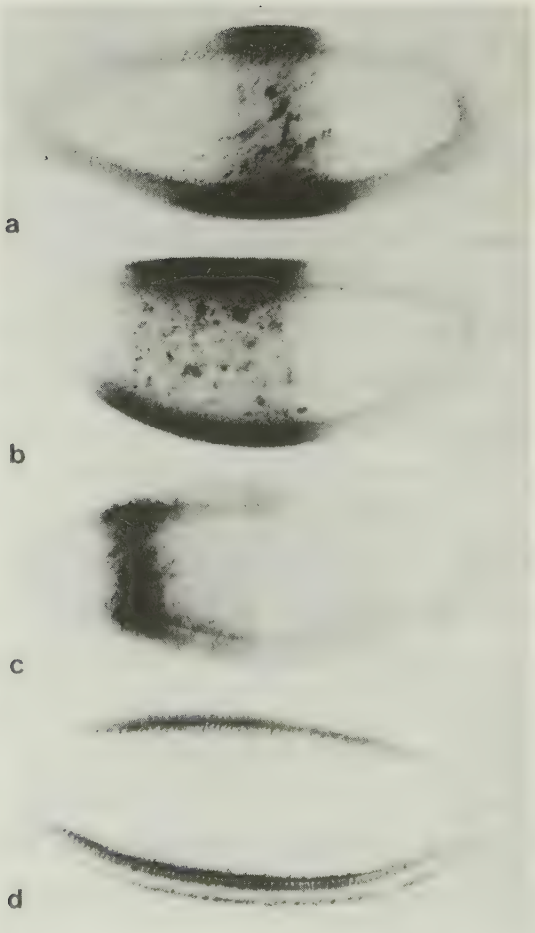
Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von Blastodermembryonen, die mit *ftz* (a,b), *hb* (c,d) und *Kr* (e,f) Antikörpern gefärbt wurden; die Em-bryonen stammen von homozygoten $stau^{HL}$ exu^{PJ} Müttern.

Aus diesen Daten wird ersichtlich, daß *Kr* und *hb* nicht imstande sind, die Expression des je anderen vollständig zu unterdrücken, wobei allerdings nicht auszuschließen ist, daß sie einen gewissen negativen Einfluß aufeinander ausüben. Obwohl eine "Vermengung" von *Kr* und *hb* Protein vorliegt, werden Pro- und Mesothorax gebildet.

2.6 Die *Kr* Proteindomäne in *BicD exu* Embryonen

Der extreme *Kr* Phänotyp weist eine Deletion aller drei Thorakalsegmente und der ersten fünf Abdominalsegmente auf: Die *Kr* Proteindomäne reicht nur bis einschließlich zur Anlage des ersten Abdominalsegments. Um zu prüfen, ob Kr^+-Aktivität für die Ausbildung der übrigen anterioren Abdominalsegmente notwendig ist, wurden *BicD exu* Embryonen untersucht.

In bicaudalen Embryonen fehlen Kopf, Thorax und anteriores Abdomen. Stattdessen sind am anterioren Ende Abdominalsegmente zusammen mit einem Telson spiegelbildlich dupliziert. Der bicaudale Phänotyp kann durch Mutation an vier verschiedenen Loci erzeugt werden (Bull, 1966; Mohler und Wieschaus, 1986). In *BicD* führen nur antimorphe Mutationen zu einem bicaudalen Phänotyp (Mohler und Wieschaus, 1985). Die bicaudale Symmetrie wird durch heterotope Lokalisation von Polplasmaaktivität am anterioren Pol erzeugt (Lehmann, 1985; Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1986). *BicD exu* Doppelmutanten bilden einen bicaudalen Phänotyp mit besonders hoher abdominaler Segmentzahl aus: Bis zu 7 Abdominalsegmente werden dupliziert (A8-A2//A2-A8) (Frohnhöfer, 1987). Daneben finden sich folgende schwächere Aus-prägungen des *BicD exu* Phänotyps: Embryonen mit reduziertem Kopfskelett, kopflose und schließlich asymmetrische bicaudale Embryonen. Die Färbungen mit den *Kr*


a
b
c
d

Antikörpern zeigen ebenfalls ein Spektrum von verschiedenen Färbemustern (Abb. 19). Durch Doppelfärbungen mit *hb* konnte sichergestellt werden, daß die Blastodermembryonen, die keine *Kr* Färbung aufweisen, tatsächlich symmetrisch bicaudal sind (Abb. 19e). Dies läßt darauf schließen, daß die Ausbildung von anterior abdominalen Segmenten (A2-A8) auch ohne *Kr*-Aktivität möglich ist. Ein endgültiger Beweis erfordert jedoch weitere Untersuchungen.

Abb. 19 Proteinverteilung von *Kr* in *BicD exu* Embryonen.

Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von Blastodermembryonen, die mit *Kr* Antikörper gefärbt wurden; die Embryonen stammen von $BicD^{IIIE}$ exu^{PJ}/$BicD^{7134}$ exu^{PJ} Müttern. In einem Gelege findet sich ein Spektrum von Färbemustern (a)-(d); durch Doppelfärbungen mit *hb* Antikörpern konnte sichergestellt werden, daß von *Kr* nicht gefärbte Embryonen (d) symmetrisch bicaudal sind; in diesen Embryonen findet sich anterior eine spiegelsymmetrische Duplikation der posterioren *hb* Domäne.

3. Die *Kr* Proteinexpression nach dem Blastodermstadium

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Expression von *Kr* in späteren Stadien der Entwicklung. Zunächst soll das komplexe raum-zeitliche Muster der *Kr* Proteinverteilung während der Normogenese des Drosophilaembryos beschrieben werden (3.1). Der Analyse von Regulation und Funktion der späten *Kr* Expression dienten die Untersuchung der phänotypischen Defekte, die diejenigen Gewebe, in denen im Wildtyp *Kr* Protein akkumuliert wird, in *Kr* Mutanten aufweisen (3.2), die Betrachtung des *Kr* Proteinmusters in anderen Mutanten (3.3), schließlich der Vergleich von *Kr* Transkript- und Proteinmuster im Wildtyp (3.4). Darüberhinaus wurden Mutanten aus der allelischen Serie von *Kr* auf ihr Proteinmuster hin untersucht (3.5).

3.1. Beschreibung des Musters der *Kr* Proteinexpression im Wildtyp

Kr Protein wird im Wildtypembryo zum ersten Mal während der Ausbildung des Blastoderms sichtbar. Während die an die Peripherie gewanderten Zellkerne von Oolemma umschlossen werden, werden kleine Mengen von *Kr* Protein in der Mittelregion des Embryos sichtbar. Neben den peripheren Kernen sind auch die Dotterkerne (Vitellophagen) dieser Region gefärbt (Abb. 20a). Die Menge an *Kr* Protein nimmt während des Zellularisierungsprozesses rapide zu, und es bildet sich eine Domäne stark gefärbter Kerne heraus, die in der dorsalen Region des Embryos 10-12 Kerne und in der ventralen Region 14-16 Kerne umfaßt (Abb. 20b). Diese Domäne der Proteinakkumulation stimmt im Rahmen der Meßgenauigkeit mit der Region überein, in der *Kr* Transkriptexpression beobachtet wird (Knipple et al., 1985). Die Proteinfärbung innerhalb der Domäne zeigt eine

Intensitätsverteilung, die als Glockenkurve zu beschreiben ist,, d.h. die Färbung ist im Zentrum der Domäne am intensivsten und nimmt zur Peripherie hin ab (s. 2.).

Während der Gastrulation finden im Embryo drei grundlegende morphogenetische Bewegungen statt: (1) Meso- und endodermale Anlagen werden invaginiert; (2) Blastodermzellen am posterioren Pol verlagern ihre Position nach dorsal und bilden die sog. "Dorsalplatte" aus, an der die Polzellen adhärieren; (3) die Kopffalte bildet sich bei ungef. 65% EL aus.
Die Gastrulation beginnt mit der Ausbildung der Kopffalte. In diesem Stadium wird neben der zentralen *Kr* Proteindomäne eine weitere Domäne der Proteinexpression am posterioren Pol sichtbar (Abb. 20c). Nach Ausbildung der Ventralfurche, aus der Mesoderm und Endoderm hervorgehen, ist *Kr* Protein innerhalb der zentralen Domäne sowohl im Ektoderm wie im Mesoderm nachweisbar (Abb. 20d). Am Ende der Gastrulation (Abb. 20e) ist die Akkumulation von *Kr* Protein in der posterioren Domäne deutlich sichtbar.
Während der Keimstreifausstreckung verschwindet die zentrale *Kr* Proteindomäne. Über die gesamte Länge des Keimstreifs wird eine schwache und transiente Färbung sichtbar, die ektodermales und mesodermales Keimblatt überstreicht. In der proktodäalen Invagination ist eine Anzahl von Zellen gefärbt, die später die Anlage der Malpighigefäße bilden werden. Anterior zur anterioren Mitteldarminvagination findet sich eine Gruppe von *Kr*-positiven Zellen, die bei Ausbildung des Stomodäums nach innen wandert (Abb. 20f).

Im ausgestreckten Keimstreifstadium ist dann ein komplexes Muster der *Kr* Proteinexpression sichtbar: Alle Zellen der Amnioserosa, der sog. extra-

a
b
c
d
e
f
g
h
i

Abb. 20 *Kr* Proteinverteilung in Wildtypembryonen: (I) Vom Blastoderm bis zum ausgestreckten Keimstreifstadium.

Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von Wildtypembryonen, die mit *Kr* Antikörper gefärbt wurden; es ist auf die sagittale Ebene fokussiert. (a) syncytiales Blastoderm; schwache Markierung in der Mittelregion des Embryo. (b) Zellularisierungsstadium; die *Kr* Domäne ist deutlich gefärbt und ventral breiter als dorsal. (c) Beginn der Gastrulation; die anteriore Grenze der *Kr* Domäne liegt 6-8 Zellen hinter der Kopffalte (Pfeile). (d) Gastrulation; *Kr* Protein ist im Mesoderm nachweisbar, Zellen der Dorsalplatte sind schwach gefärbt. (e) Ende der Gastrulation/Beginn der Keimstreifausstreckung; die Färbung in den Zellen der Dorsalplatte ist stärker ausgeprägt. (f) Ende der schnellen Phase der Keimstreifausstreckung; die frühere zentrale Domäne der *Kr* Expression ist verschwunden. Eine "patchy" Färbung entlang des Keimstreifs ist zu beobachten, sie überstreicht sowohl Ekto- wie Mesoderm. Im Proktodäum ist eine Färbung sichtbar, die auf die Zellen der Malpighianlagen beschränkt ist. (g) ausgestreckter Keimstreif, dorsale Ansicht; es ist auf die knospende Malpighianlage fokussiert. Im invaginierenden Stomodäum ist eine starke Färbung sichtbar, ebenso in der Amnioserosa (Pfeil). (h),(i) Beginn der Keimstreifverkürzung; Amnioserosa und Stomodäum (Pfeile) weisen eine starke Färbung auf, ebenso die ventrale neurogene Region.

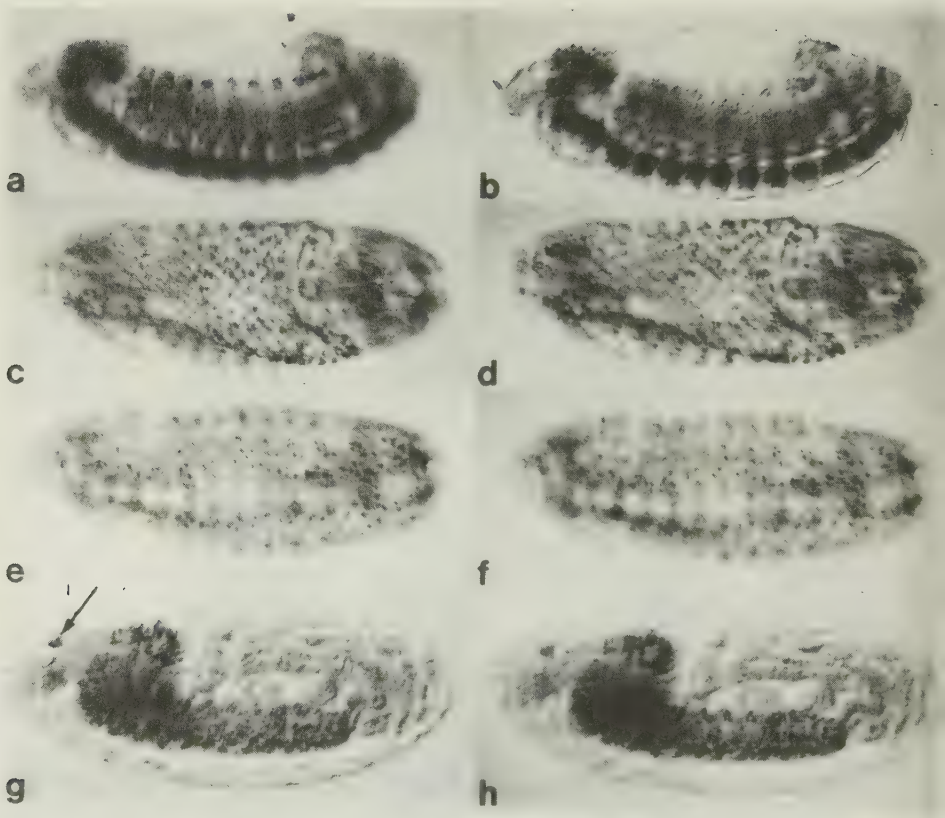


Abb. 21 *Kr* Proteinverteilung in Wildtypembryonen:
(II) Keimstreifverkürzung und später.

Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von Wildtypembryonen, die mit *Kr* Antikörper gefärbt wurden. (a)-(f) Keimstreifverkürzung; (a),(b) der Keimstreif ist vollständig zurückgezogen; *Kr* Markierung ist im ZNS, der Amnioserosa und, in lateraler Position, von Muskelvorläuferzellen (Pfeile) zu sehen. (c)-(f) späte Phase der Keimstreifverkürzung; (c),(d) dorsale Ansicht; die Zellen der Amnioserosa sind gefärbt. (e),(f) ventrale Ansicht; im ventralen Nervensystem ist in jedem Neuromer eine Subpopulation von Nervenzellen gefärbt; in lateraler Position sind Muskelvorläuferzellen markiert. (g),(h) Stadium 15 Embryo; das ventrale Nervensystem ist bereits kontrahiert. Im gesamten ZNS färbt eine Subpopulation von Nervenzellen. In dorsaler Position im Kopf (Pfeil) ist das Bolwigorgan, das larvale Lichtsinnesorgan markiert.

embryonalen Membran, sowie die Zellen der Malpighianlage sind stark gefärbt. Einige der neurogenen Regionen im Embryo sind ebenfalls markiert: Prominent ist die Färbung einer Gruppe von Zellen, die im dorsalen Dach des Stomodäums lokalisiert ist; aufgrund ihrer Lage könnten sie Vorläufer des stomatogastrischen Nervensystems sein. Sowohl im prospektiven Bauchmark wie im Procephalon wird zunächst eine große Anzahl von Neuroblasten und später eine ebenfalls große Anzahl von Neuronen gefärbt (Abb. 20g,h,i).

Während des Stadiums der Keimstreifverkürzung werden die embryonalen Organe in die für die Larve charakteristische anatomische Lage gebracht; der Embryo erhält seine endgültige, segmentale Gliederung.
Das Muster der *Kr* Proteinexpression erfährt in dieser Entwicklungsphase weitere Veränderungen. Die Zellen der Amnioserosa, die inzwischen die dorsale Oberfläche des Embryo bedecken, sind nach wie vor gefärbt (Abb. 21c,d), dagegen verschwindet die Färbung in den sich ausbildenden Malpighigefäßen. Bereits im ausgestreckten Keimstreif sind lateral von der neurogenen Region einige wenige Zellen pro Segment *Kr*-positiv, die während der Keimstreifverkürzung proliferieren. Die Tochterzellen verlagern sich in dorsaler Richtung und bilden ein segmentspezifisches Muster von Zellgruppen aus (Abb. 21a). Vermutlich handelt es sich bei dieser Population von Zellen um die Vorläufer von Muskelzellen (V. Hartenstein, persönliche Mitteilung).
Das gesamte Zentralnervensystem weist eine Färbung auf (Abb. 21a,b), wobei sowohl im Supraösophagalganglion wie auch im Bauchmark nur eine Subpopulation von Nervenzellen *Kr*-positiv ist (Abb. 21e,f). Diese Markierung des ZNS persistiert, wobei die Zahl der positiven Zellen im Laufe der weiteren Entwicklung abzunehmen scheint. In sehr alten

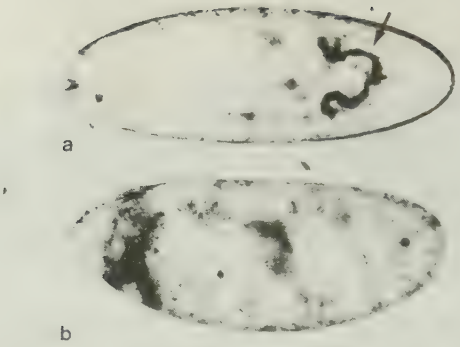


Abb. 22 In amorphen *Kr* Embryonen fehlen Malpighigefäße; Lebendbeobachtung schlüpfreifer Embryonen.

(a) Wildtypembryo; die Malpighigefäße sind als dunkle Schläuche im posterioren Drittel des Embryos zu erkennen. (b) homozygoter Kr^1 Embryo; es sind keine Malpighigefäße erkennbar.

Abb. 23 Die Amnioserosa von amorphen *Kr* Embryonen in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen

(a)-(c) Kr^1 Embryonen; (a) und (b) derselbe Embryo: (a) ventrale Aufsicht, (b) dorsale Aufsicht. Die Amnioserosa ist als Struktur deutlich ausgebildet.

Embryonen wird in der Kopfregion eine paarig angelegte Gruppe von Zellen in dorsaler Position stark angefärbt; aufgrund ihrer Lage wurde diese Struktur als Bolwigorgan (das larvale Photorezeptororgan) identifiziert (Abb. 21g,h).

3.2 Späte phänotypische Defekte in *Kr* Mutanten

Nach dem Blastodermstadium, in dem das "Vormuster" der späteren Segmentierung festgelegt wird, ist das *Kr* Protein im Wildtyp, wie beschrieben, in einer Anzahl von Geweben exprimiert: in der Amnioserosa, den Mapighianlagen, im Nervensystem und möglicherweise in Vorläuferzellen der somatischen Muskulatur. Um zu prüfen, ob mit dieser späten Expression Defekte in den entsprechenden Geweben bei *Kr* Mutanten korrelieren, wurden amorphe *Kr* Embryonen auf morphologisch sichtbare Störungen hin untersucht.

1. Im schlüpfreifen Wildtypembryo sind die Malpighigefäße sehr leicht *in vivo* zu erkennen. Im Durchlicht erscheinen sie als dunkle Schläuche im posterioren Drittel des Embryo. Sie entstehen als Ausstülpungen des Proktodäums an der Mittel-Enddarm-Grenze; sie flottieren frei in der Leibeshöhlenflüssigkeit und dienen der Larve als Exkretionsorgan. In amorphen *Kr* Embryonen sind keine Malpighischen Gefäße ausgebildet (s. Gloor, 1954) (Abb. 22).

2. Eine Analyse möglicher phänotypischer Defekte im Nervensystem von *Kr* Mutanten ist durch den Segmentierungsdefekt, von dem Thorax und weite Teile des Abdomens betroffen sind, sehr erschwert. Hinzu kommt, daß bei Mutanten mit extremem Phänotyp der Kopf nicht involutiert,

Abb. 24 Proteinverteilung von *Kr* in Mutanten der dorso-ventralen Achse.

Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von mutanten Embryonen, die m
Kr Antikörper gefärbt wurden. (a) *zen*⁻ Embryo (*Df(3R)LIN/Df(3R)LIN*); es wir
keine Amnioserosa ausgebildet; ein entsprechendes *Kr* Signal fehlt. (b) *sna* Embryo
(sna^{IIGO5}/sna^{IIGO5}); zu einem Zeitpunkt, in dem im Wildtyp bereits ei
Muskelvorläuferzellen-spezifisches *Kr* Signal vorliegt, ist in *sna* Embryonen keine
entsprechende Färbung sichtbar..

wodurch die anatomischen Lageverhältnisse im Kopfbereich verändert sind. Aus diesen Gründen wurden nur die von der Segmentierungsstörung nicht betroffenen Segmente des posterioren Abdomens betrachtet.

Mutante *Kr* Embryonen wurden mit HRP-Antikörper, der für die Fasern im ZNS spezifisch ist, gefärbt; es zeigte sich, daß auch die Neuromere des posterioren Abdomen ein gegenüber dem Wildtyp defektes Muster zeigen. Die Defekte zeigen einige Variabilität, dennoch ist deutlich, daß kein regelmäßiges Muster von Konnektiven und Kommissuren ausgebildet wird. Die Kommissuren sind z.T. verkürzt; mitunter werden keine Konnektive ausgebildet. Eine weiterführende Analyse dieser Störungen auf zellulärem Niveau wurde nicht durchgeführt.

3. Die Amnioserosa ist eine transiente Struktur des Embryos, die von ungef. 200 Zellen aus einem Streifen der dorsomedialen Region des Blastoderm gebildet wird. Während der Keimstreifverkürzung dient sie als dorsale Bedeckung des Embryos, bis sie von der Epidermis überwachsen wird. Danach löst sie sich als Struktur auf; die individualisierten Zellen werden in das dorsale Gefäß aufgenommen, um Perikard auszubilden (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985).

Die Untersuchung amorpher *Kr* Embryonen im Rasterelektronenmikroskop zeigt, daß diese durchaus eine Amnioserosa ausbilden (Abb. 23). - Das weitere Schicksal der Amnioserosazellen in *Kr* Mutanten wurde bislang nicht näher verfolgt.

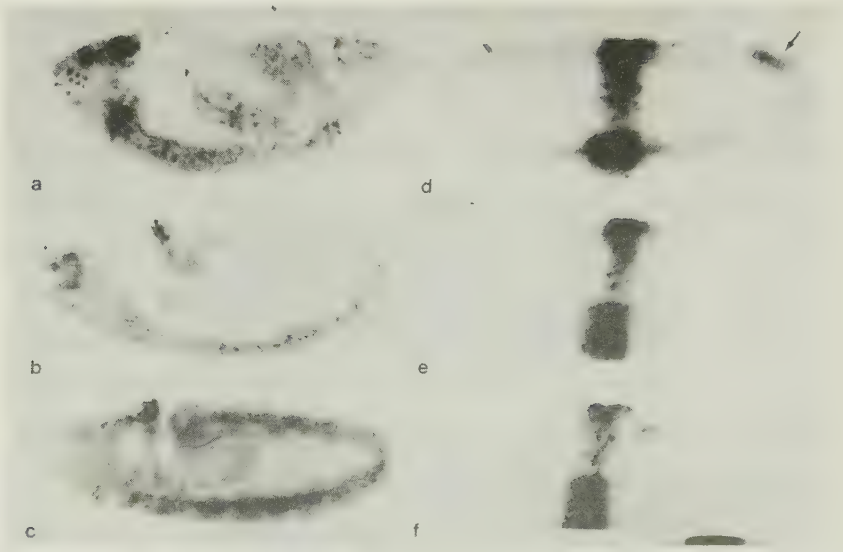


Abb. 25 *Kr* Proteinverteilung in *tor*, *tll* und *fkh* Embryonen.

Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von mutanten Embryonen, die mit *Kr* Antikörper gefärbt wurden.

(a) *tor* Embryo (Genotyp der Mutter tor^{PM}/tor^{HH}), ausgestreckter Keimstreif; im dorsalen Kopfbereich ist ein Gruppe von Zellen etwas stärker gefärbt; dies ist vermutlich das Stomodäumsignal von *Kr*. Frohnhöfer (1987) beschreibt, daß in *tor* Embryonen das Stomodäum aufgrund der anomalen Keimstreifausstreckung dorsal invaginiert. (b) *tll* Embryo (tll^{L10}/tll^{L10}), ausgestreckter Keimstreif; während das *Kr* Stomodäumsignal vorhanden ist, fehlt die für den Wildtyp typische kräftige Färbung an knospenden Malpighianlagen. (c) *fkh* Embryo (fkh^3/fkh^3), ausgestreckter Keimstreif; sowohl das Stomodäum- wie das Malpighisignal von *Kr* fehlen. (d) Wildtypembryo, Beginn der Gastrulation; der Pfeil markiert das Malpighisignal in der Dorsalplatte. (e),(f) *fkh* Embryonen in der Gastrulation; das Malpighisignal in der Dorsalplatte fehlt

3.3 Regulation der *Kr* Proteinexpression nach dem Blastodermstadium

Für eine Analyse der späten *Kr* Proteinexpression in Mutanten gibt es zwei Beweggründe, die miteinander im Zusammenhang stehen. Zum einen möchte man die Gene finden, die die *Kr* Proteinexpression kontrollieren. Bei fortgeschrittener Entwicklung und zunehmendem Komplexitätsgrad des Systems ist dies nicht einfach, da die beobachteten Effekte sehr mittelbare Konsequenzen des Fehlens des je fraglichen Gens sein können. Zum anderen möchte man aus der Mutantenanalyse Rückschlüsse ziehen auf die Funktion von *Kr* im Differenzierungsprozeß. So fragt sich, ob *Kr* als "Positionsmarker" oder als "Differenzierungsmarker" fungiert, d. h.: Markiert *Kr* die räumliche Lokalisation von Zellen unabhängig von deren Differenzierungsschicksal, und liegt seine Expression somit der Entscheidung über die Differenzierung voraus - oder ist demgegenüber die Expression von *Kr* Ausdruck oder Folge einer Differenzierungsentscheidung?

Sowohl Amnioserosa wie Muskel und ventrales Nervensystem sind Strukturen, die Differenzierungen der dorso-ventralen Achse darstellen. Eine Anzahl maternaler wie zygotischer Gene legt unabhängig von der antero-posterioren Information das Schicksal der Blastodermzellen bezüglich der dorso-ventralen Achse fest (Anderson, 1987).
Zur Untersuchung der Amnioserosamarkierung wurden *zerknüllt* (*zen*) und *tolloid* (*tld*) Mutanten verwendet, die einen schwach ventralisierenden Phänotyp zeigen, wobei keine Amnioserosa mehr ausgebildet wird und die dafür vorgesehenen Zellen in die dorsale Epidermis integriert sind (Jürgens, pers. Mitteilung). Tatsächlich wird in *zen* und *tld* Embryonen kein *Kr* Protein an einer der Amnioserosa entsprechenden

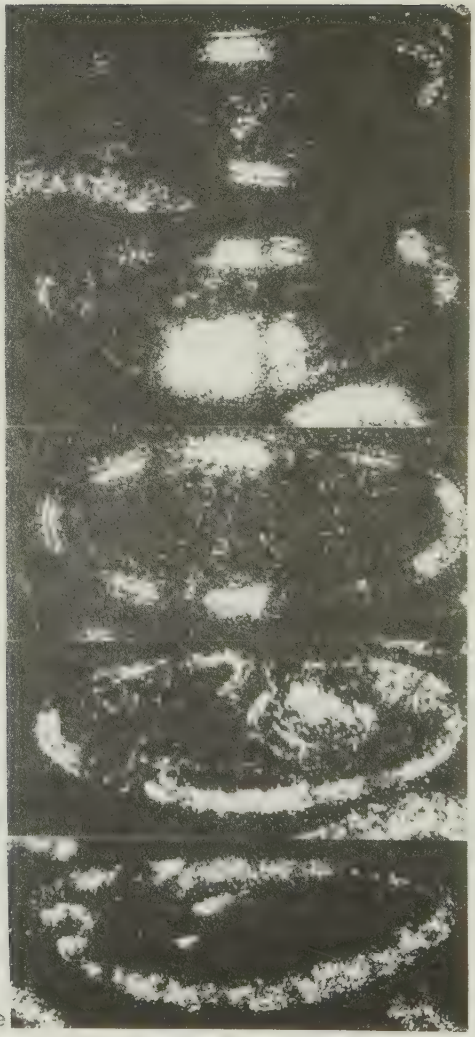

a
b
c
d
e

Abb. 26 In situ Hybridisierung von *Kr* Probe an Gewebeschnitten von Wildtypembryonen.

(a),(b),(d),(e) Parasagittalschnitte; (c) Horizontalschnitt. (a) spätes Blastoderm; die zentrale *Kr* Domäne ist sichtbar, eine weitere Domäne der *Kr* Transkriptakkumulation am posterioren Pol, eine dritte, mit geringerer Akkumulation, bei 80% EL. (b) Gastrulation; am anterioren Pol wird ein zusätzliches Signal sichtbar. (c) Horizontalschnitt, Gastrulation; (d) Keimstreifausstreckung; die zentrale *Kr* Domäne ist nicht mehr vorhanden; *Kr* Transkript akkumuliert über die gesamte Länge des Keimstreifs. Das Signal vom anterioren Pol ist in ventrale Position gerückt. (e) ausgestreckter Keimstreif; entlang des Keimstreif ist eine "patchy" Akkumulation von *Kr* Transkript zu sehen, in der proktodäalen Invagination ist das *Kr* Signal deutlich sichtbar. Im Kopfbereich sind zwei der Regionen der Transkriptakkumulation zu erkennen, eine im dorsalen Bereich (procephale neurogene Region?) und eine zweite in der stomodäalen Invagination.

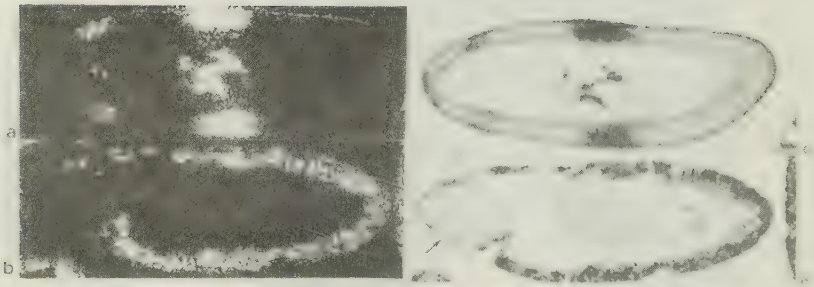


Abb. 27 In situ Hybridisierung von *Kr* Probe an *fkh* Embryonen.

Parasagittalschnitte von fkh^3 Embryonen; (a),(b) Dunkelfeld-, (c),(d) Hellfeldaufnahmen. (a),(c) spätes Blastoderm; obwohl die Transkriptdomäne bei ungef. 80% EL bereits ausgebildet ist, ist am posterioren Pol kein Transkript nachweisbar. (b),(d) ausgestreckter Keimstreif; sowohl Stomodäum- (Pfeil) wie Malpighisignal fehlen.

Position beobachtet (Abb. 24a). *Kr* Proteinexpression ist somit nur solange vorhanden, wie die dorsomedialen Zellen zu Amnioserosa differenzieren, werden dagegen diese Zellen determiniert, dorsale Epidermis auszubilden, wird *Kr* nicht angeschaltet.

Mutanten, die keine Ventralfurche während der Entwicklung ausbilden und deshalb als dorsalisierend eingestuft werden, wurden auf die Ausprägung der "muskelspezifischen" Expression von *Kr* hin untersucht. Es zeigt sich, daß in den schwach dorsalisierenden Mutanten *snail* (*sna*) und *twist* (*twi*) wenig oder gar kein "muskelspezifisches" *Kr* Proteinmuster ausgebildet wird (Abb. 24b); dies korrespondiert mit der Beobachtung, daß diese Mutanten wenig oder kein Mesoderm ausbilden, die Voraussetzungen für eine *Kr* Expression wären also nicht mehr gegeben.

Diese Befunde deuten insgesamt darauf hin, daß *Kr* Protein gewebe- und nicht regionsspezifisch exprimiert wird, d.h. daß *Kr* als "Differenzierungsmarker" fungiert (s.o.)

Es ist zu erwarten, daß die Expression von *Kr* Protein in Stomodäum und Malpighianlagen primär unter der Kontrolle von Genen steht, die zum antero-posterioren System gerechnet werden. Es existiert eine Anzahl von maternalen und zygotischen Mutanten, in denen die terminalen Regionen des Embryo von Defekten betroffen sind. Aufgrund ihres Phänotyps sind in unserem Zusammenhang die Gene der (maternalen) *torso*-Gruppe (*torso* (*tor*), *trunk* (*trk*)), *tailless* (*tll*) als Gap Gen und *forkhead* (*fkh*) als homöotisches Gen von Interesse:

In Mutanten der *torso*-Gruppe fehlen posterior das Telson und zusätzlich einige wenige posteriore Zähnchenbänder; Proktodäum (und damit auch Malpighi-gefäße) und hinterer Mitteldarm werden nicht gebildet. Anterior findet sich eine stark verkleinerte Kopfregion. Pharynx und Ösophagus, die

aus dem Stomodäum hervorgehen, sind vorhanden, allerdings in ihrer Größe reduziert (Schübach und Wieschaus, 1986). Die Färbung mit *Kr* Antikörpern zeigt, daß das Malpighi-spezifische Signal fehlt; im Kopfbereich sind die anatomischen Verhältnisse schwer gestört, so daß das Stomodäum nicht wie normal ventral, sondern dorsal eingestülpt wird (Frohnhöfer, 1987). Es findet sich dort allerdings eine stärkere *Kr* Färbung, die dem Signal im Stomodäum entsprechen könnte (Abb. 25a).

In *tll* Embryonen fehlen in der Kutikula das Abdominalsegment 8 und das Telson; hinterer Mitteldarm und Enddarm sind vorhanden, nur die Malpighigefäße fehlen. Anterior sind Defekte im Clypeolabrum, dem Procephalon und dem "optic lobe" beschrieben (Strecker et al., 1986). Die Antikörperfärbung zeigt deutlich, daß einerseits das Malpighi-spezifische *Kr* Proteinsignal fehlt, andererseits das Stomodäum-spezifische *Kr* Proteinsignal vorhanden ist (Abb. 25b).

In *fkh* Embryonen fehlen posterior die Derivate des Proktodäums (Hinterdarm und Malpighigefäße) und in der Kutikula die Analplatten. Anterior sind die Derivate des Stomodäums (Pharynx und Ösophagus) deletiert (Weigel, pers. Mitteilung). Somit gehen die Ausfallbereiche von *fkh* über die beiden terminalen Domänen der *Kr* Proteinexpression im Wildtyp hinaus.

Die Untersuchung des *Kr* Proteinmusters in *fkh* Embryonen zeigt, daß sowohl das Stomodäum-spezifische Signal wie das Malpighi-spezifische Signal fehlen (Abb. 25c). Bereits bei Bildung der Dorsalplatte, die in fkh Embryonen eine anomale Morphologie aufweist, ist das Fehlen der *Kr* Proteinexpression erkennbar (Abb. 25e,f; vgl a (WT)).

Durch *in situ* Hybridisierung von *Kr* Probe an Gewebeschnitten von *fkh* Embryonen wurde geprüft, ob bereits die früheste Expression in den terminalen Regionen fehlt. Im Wildtypembryo werden zusätzlich zur

zentralen *Kr* Transkriptdomäne folgende Regionen der Transkriptakkumulation nach und nach sichtbar (Abb. 26): zunächst eine Kappe von Zellen am posterioren Pol (Malpighianlage), die später mit der Dorsalplatte wandern, dann anterior von der zentralen Domäne ein Streifen von Zellen, der in seiner Lage der procephalen neurogenen Region entspricht (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985), und während der Gastrulation eine anteriore Kappe von Zellen (Stomodäum-spezifisches Signal), die sich nach ventral verlagert und schließlich ins Stomodäum invaginiert.

In *fkh* Embryonen werden beide terminalen *Kr* Transkriptdomänen (Malpighianlagen und Stomodäum) nicht ausgebildet, während der Streifen der Transkriptexpression bei ungefähr 80 % EL vorhanden ist (Abb. 27).

Diese Befunde deuten darauf hin, daß *fkh* - ein homöotisches Gen - als positiver Regulator der terminalen *Kr* Expression fungiert.

Abb. 28 *Kr* Proteinverteilung am Gewebeschnitt eines Stadium 15 Wildtypembryos.

Indirekte Immunfluoreszenz an einem parasagittalen Gefrierschnitt durch einen Wildtypembryo, bei dem sich die Epidermis bereits dorsal geschlossen hat (ungef. 12 h). Sowohl im ventralen Nervensystem wie im Supraösophagalganglion geben vereinzelte Kerne prominente Signale. (a) *Kr* Färbung, (b) DAPI Färbung.

3.4 Vergleich von *Kr* Transkript- und Proteinmuster im Wildttyp

Vergleicht man das Muster der späten *Kr* Proteinexpression im Wildtyp mit der Transkriptverteilung, so fällt auf, daß zwar im wesentlichen dieselbe raum-zeitliche Verteilung vorliegt, daß aber das quantitative Verhältnis von Protein und Transkript variiert. So wird in der Dorsalplatte *Kr* Transkript in großer Menge akkumuliert, die korrespondierende Proteinfärbung ist dagegen sehr schwach. Besonders augenfällig wird diese Diskrepanz beim Vergleich der Verteilungsmuster im Nervensystem. Das *Kr* Protein wird, wie oben in Abb. 21 gezeigt, nur in einer Subpopulation neuraler Kerne stark akkumuliert; in Gewebeschnitten von 10 um Dicke sind daher nur einige wenige und "verstreut liegende" Kerne prominent gefärbt. Demgegenüber zeigen *in situ* Hybridisierungen der *Kr* Probe auf Gewebeschnitten, daß das gesamte Nervengewebe *Kr* Transkript akkumuliert (Abb. 28).
Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Verteilung des *Kr* Proteins nicht allein durch Kontrolle der Transkription zustande kommt, sondern daß eine weitere Regulation auf posttranskriptioneller Ebene erfolgt.

Welcher molekulare Mechanismus könnte einer solchen posttranskriptionellen Kontrolle zugrunde liegen?
Wie bereits im ersten Kapitel ausgeführt, kodiert *Kr* zwei Transkripte, von denen das eine ein 372 bp langes Intron besitzt, das im anderen herausgespleißt ist. Die "Northernblot" Analyse zeigt nun, daß im Blastoderm sowohl das Intron-enthaltende Transkript wie das gespleißte Transkript vorhanden sind, daß aber nach dem Blastoderm nur noch Intron-RNA nachweisbar ist (Abb. 29 l,m). *In situ* Hybridisierung einer Intron-

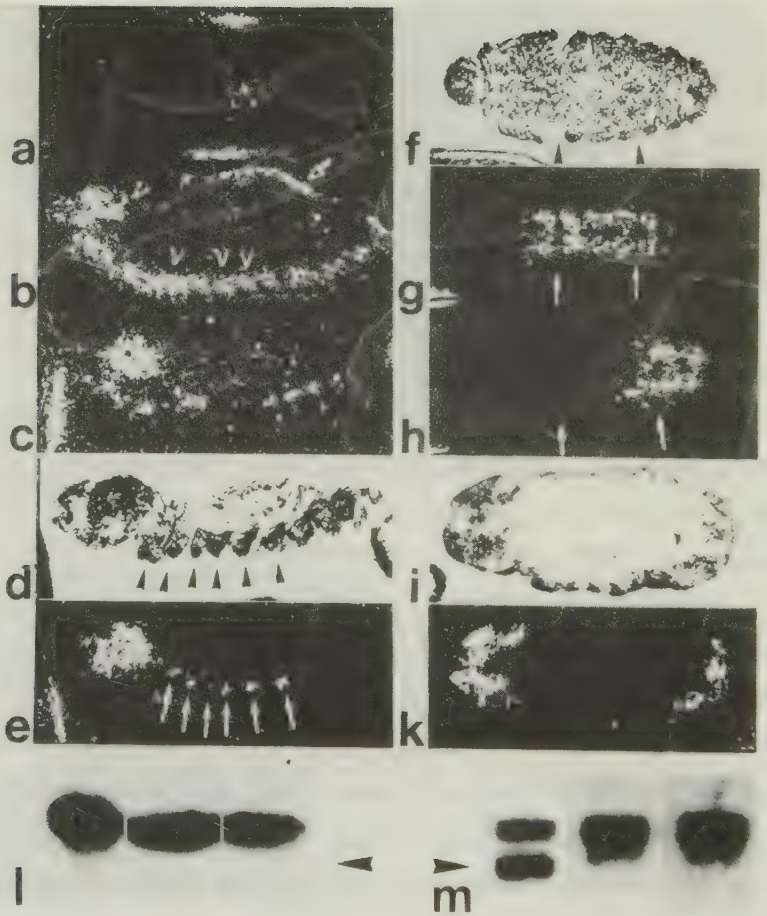

a
b
c
d
e
f
g
h
i
k
l
m

Abb. 29 Räumliche und zeitliche Verteilung von gespleißtem und Intron-enthaltendem *Kr* Transkript.

Gewebeschnitte von Wildtypembryonen wurden mit Intron-spezifischer *Kr* Probe (a)-(c), (h)-(k), oder mit der *Kr* Gesamtprobe (s. Rosenberg et al.,1986) (d)-(g) hybridisiert.
(a) Intronprobe, Blastodermembryo. Die Intronprobe zeigt dieselbe Verteilung wie die *Kr* Gesamtprobe.
(b)-(e) Embryo nach der Keimstreifverkürzung; (b),(c) Intronprobe; (b) Embryo nach Keimstreifverkürzung, (c) Stadium 14 Embryo; (d),(e) Gesamtprobe; (d) ein an (c) anschließender Schnitt, (e) Dunkelfeldaufnahme von (d). Transkript ist im gesamten Nervensystem zu sehen (Pfeile in (b)). In (d) sind Signale über Muskelzellen sichtbar.
(f)-(k) Horizontalschnitte durch Embryonen nach der Keimstreifverkürzung; (f),(g) Gesamtprobe; (h) an (g) anschließender Schnitt, mit Intronprobe hybridisiert; (i),(k) Intronprobe.
In all diesen Schnitten ist über dem gesamten Nervengewebe *Kr* Transkript akkumuliert.
(l),(m) "Developmental Northernblots", die zeigen, daß gespleißte *Kr* RNA nur im Blastoderm und während der Gastrulation vorhanden ist. Jede Bahn des Blots ist mit polyA$^+$ RNA von ungefähr 500 Embryonen, deren Alter individuell bestimmt wurde, beladen: jeweils von links nach rechts (1) Blastoderm, (2) ausgestreckter Keimstreif und (3) Keimstreifverkürzung. Die "Northernblots" wurden mit der *Kr* Intronprobe (l), bzw. mit *Kr* Gesamtprobe (m) hybridisiert. In Embryonen mit ausgestrecktem Keimstreif ist kein gesplictes *Kr* Transkript mehr detektierbar (Pfeilspitzen).

spezifischen Probe mit embryonalen Gewebeschnitten zeigt dieselbe Signalverteilung wie die *Kr* Gesamtprobe (Abb. 29a-k). Es legt sich nun nahe, als Mechanismus für eine posttranskriptionelle Kontrolle differentielles "Spleißen" anzunehmen: In späteren Stadien liegt zunächst nur die Intron-enthaltende RNA vor, die erst nach Entfernen des Introns translatiert werden kann; dieses Spleißen der RNA unterliegt einer räumlichen Kontrolle, die zur spezifischen Akkumulation translatierbarer RNA und - im Gefolge - des *Kr* Proteins führt.

Ein solcher Mechanismus würde jedoch voraussetzen, daß die Intron-haltige *Kr* RNA nicht translatierbar ist. Wie sich zeigt, läßt sich die Intron-haltige RNA *in vitro* aber sehr wohl translatieren (s. 1.2, Abb. 2); es wird ein Produkt gebildet, dessen apparentes Molekulargewicht nicht vom Produkt der gespleißten RNA zu unterscheiden ist. Bei Betrachtung der Gensequenz wird dieser Befund erklärlich. Das Intron liegt nahe dem 5´ Ende der kodogenen Region (37 bp nach dem ersten ATG) und besitzt an seinem 3´ Ende ein Startkodon im selben Leseraster, das im gespleißten Transkript für *Kr* Protein kodiert (s.1.2, Abb. 1); bei Benutzung des Intron-Startkodons wird somit ein *Kr* Protein gebildet, dem die ersten 13 Aminosäuren fehlen.

Allerdings kann von dieser *in vitro* Translatierbarkeit des Intron-enthaltenden Transkripts nicht auf die *in vivo* Translatierbarkeit geschlossen werden, und eine direkte experimentelle Überprüfung analog den Injektionsversuchen im Blastoderm ist in späteren Stadien aus technischen Gründen nicht mehr möglich.

Wenn auch gegenwärtig weitergehende Aussagen über den Mechanismus einer posttranskriptionellen Kontrolle nicht möglich sind, so kann doch festgehalten werden, daß eine zeitliche Korrelation zwischen dem Vorhandensein ausschließlich Intron-haltiger RNA und dem Auftreten

posttranskriptioneller Kontrolle besteht, daß aber die Intron-haltige RNA durchaus selbst funktionelles *Kr* Protein liefern könnte.

3.5 Analyse der *Kr* Proteinexpression in verschiedenen *Kr* Allelen

Schließlich wurde die *Kr* Proteinexpression in verschiedenen *Kr* Mutanten untersucht und ein Vergleich mit den phänotypischen Defekten in mutanten Embryonen vorgenommen. Aufgrund der Stärke der Antikörperfärbung läßt sich die relative Menge an *Kr* Protein in den spezifischen Geweben abschätzen; die Schwere der korrespondierenden phänotypischen Defekte läßt dann Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit des Proteins zu. Der Vergleich von Phänotyp und Proteinexpression vermittelt ferner eine Vorstellung davon, ob ein funktionell wichtiger Bereich des Gens von der Mutation betroffen ist.

Die *Kr* Allele können bezüglich des Segmentierungsdefekts in eine allelische Serie geordnet werden (Preiss et al., 1985): Der extreme *Kr* Phänotyp ist durch den Ausfall aller Thorakal- und der ersten fünf Abdominalsegmente gekennzeichnet. Der Kopf ist nicht eingestülpt und das 6. Abdominalsegment wird spiegelbildlich dupliziert. Der intermediäre *Kr* Phänotyp ähnelt dem extremen, jedoch wird keine Polaritätsumkehr im Abdomen beobachtet. Im schwachen *Kr* Phänotyp ist das erste Thorakalsegment vorhanden, es fehlt eine variable Anzahl von Abdominalsegmenten.
Von den verfügbaren *Kr* Allelen wurden nur diejenigen analysiert, die auf DNA-Ebene keine größere Deletion in der *Kr* Region aufweisen (2 P-induzierte Allele; die übrigen EMS-Mutanten), wobei alle drei Phänotyp-

Tabelle 2 . Analyse mutanter *Kr* Embryonen

Mutante *Kr* Embryonen der verschiedenen Entwicklungsstadien wurden mit *Kr* Antikörpern gefärbt; zudem wurden schlüpfreife Embryonen auf die Entwicklung von Malpighigefäßen hin untersucht. Bei den Färbungen wurde keine durchgängige Quantifizierung versucht; Besonderheiten diesbezüglich sind im Text beschrieben.
Abkürzungen: Segm. Segmentierungsphänotyp; MPG: Malpighigefäße; AS: Amnioserosa; MPA: Malpighianlagen; Stom: Stomodäum; Musk: Muskelvorläuferzellen; NS: Nervensystem; Blast: Blastoderm; ex: extremer, im: intermediärer, s: schwacher Phänotyp.

	Phänotyp		Antikörperfärbung					
Allel	Segm	MPG	AS	MPA	Stom.	Musk.	NS	Blast.
J1	ex	-	-	-	-	-	-	
2	ex	-	-	-	-	-	-	
3	ex	-	-	-	-	-	-	
7	ex	-	-	-	-	-	-	
8	ex	-	-	-	-	-	-	
9	ex	-	+	+	+	+	+	+
21	ex	+	+	+	+	+	+	-
IV	im	+/-	+	+	+	+	+	
IO66	s	+	+	+	+	+	+	
IIE57	s	+	+	+	+	+	+	
V	s	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
VII	s	+	+	+	+	+	+	
VIII	s	+	+	+	+	+	+	
IX	s	+	+	+	+	+	+	
X	s	+	+	+	+	+	+	
XI	s	+	+	+	+	+	+	
XII	s	+	+	+	+	+	+	
62	s	-	+	+/-	+	+	+	+

klassen der allelischen Serie vertreten sind (Zusammenfassung s. Tabelle 2). Eine Gruppe von Mutanten (Kr^2, Kr^3, Kr^7, Kr^8) ist zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung in der *Kr* Färbung positiv. Da alle überdies den extremen Phänotyp ausbilden und keine Malpighigefäße besitzen, wird vermutlich überhaupt kein funktionelles *Kr* Protein gebildet. Über die Position der Mutation läßt sich keine Aussage machen; sie könnte sowohl in der kodogenen Region des Gens (z.B. Stop am 5´ Ende) wie auch in einer Regulationsregion liegen.

In zwei Mutanten, nämlich den beiden P-Allelen (Kr^{21} und Kr^{62}) kommt es zu einer je spezifischen Störung im *Kr* Proteinmuster: In Kr^{21} fehlt die blastodermspezifische *Kr* Proteinexpression, während die späte Proteinexpression normal ist. Die Embryonen besitzen einen extremen Segmentierungsphänotyp, bilden aber Malpighigefäße aus. Demgegenüber ist in Kr^{62} die blastodermspezifische *Kr* Proteinexpression nicht sichtbar verändert, dagegen ist die Proteinexpression in den Malpighigefäßen stark reduziert. Den Embyronen fehlen Malpighigefäße, während die Segmentierung kaum gestört ist.

In beiden Mutanten kann also im Prinzip funktionelles *Kr* Protein gebildet werden, da im einen Fall die Ausbildung der Malpighigefäße und im anderen die Segmentierung (fast) normal ist. Die Störung der Genfunktion liegt daher vermutlich im regulatorischen Bereich. Da in Kr^{21} spezifisch die frühe Expression gestört ist, ist anzunehmen, daß die Promoterregionen für frühe und späte *Kr* Transkription verschieden und damit auf der DNA räumlich voneinander getrennt sind. Da in Kr^{62} insbesondere in der Malpighianlage die *Kr* Proteinexpression sichtbar vermindert ist, könnte ein gewebespezifisches Kontrollelement von der Mutation betroffen sein.

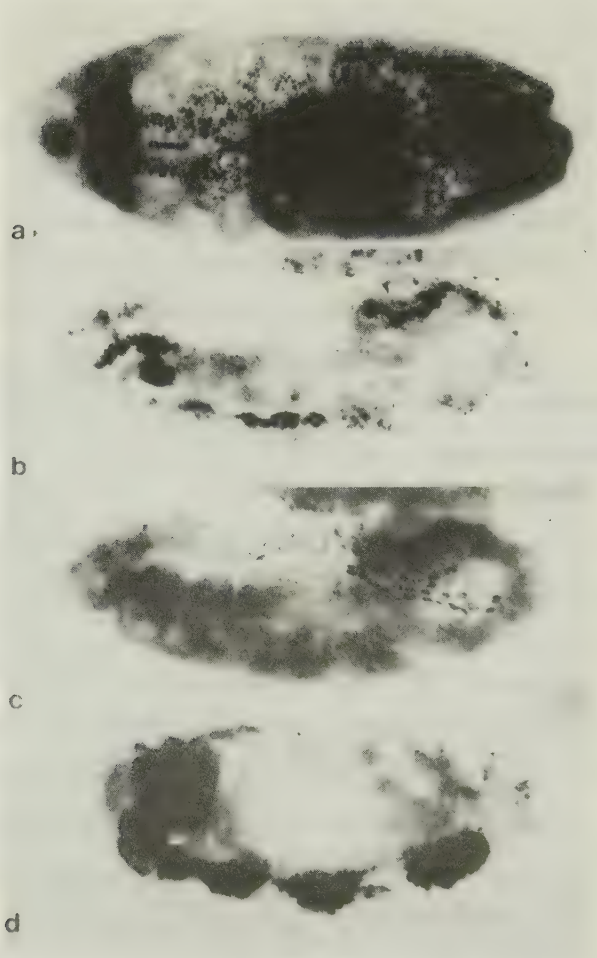


Abb. 30 *Kr* Färbung an Kr^9 Embryonen.

Optische Schnitte durch "whole mount" Präparate von mutanten Kr^9 Embryonen, die mit *Kr* Antikörper gefärbt wurden. (a) ausgestreckter Keimstreif, ventrale Ansicht; starke Akkumulation von *Kr* Protein ist insbesondere in der neurogenen Region zu beobachten. (b),(c) Embryo während der Keimstreifverkürzung. (Der Keimstreif erscheint im Vergleich zum Wildtyp etwas verfrüht zurückgezogen). Das Signal im Stomodäum erscheint prominent. Dasjenige Signal, das im Wildtyp die Malpighianlagen markiert (Pfeilspitze) ist vorhanden, jedoch ist das Gewebe, in dem es erscheint, nicht senkrecht zur Embryonallängsachse orientiert, wie dies für die knospenden Malpighianlagen gilt, sondern parallel zu dieser Achse. Aufgrunddessen ist zu vermuten, daß die *Kr* positiven Zellen im hinteren Mitteldarm integriert sind.
(d) Embryo nach der Keimstreifverkürzung (Stadium 15). Das gesamte ZNS weist eine extrem starke *Kr* Färbung auf.

In allen übrigen betrachteten Mutanten (s. Tabelle 2) konnte sowohl frühe wie späte *Kr* Proteinexpression mit Antikörperfärbung nachgewiesen werden.

Kr^9 ist dabei besonders bemerkenswert: Mutante Embryonen zeigen zwar eine sehr intensive *Kr* Antikörperfärbung, bilden aber einen extremen Segmentierungsphänotyp aus; es fehlen Malpighigefäße. Dies deutet darauf hin, daß das *Kr* Protein in seiner Funktion schwer gestört ist. Ferner kommt es zu einer sehr starken Akkumulation von *Kr* Protein in allen Geweben, in denen im Wildtyp *Kr* Protein exprimiert wird; die Antikörperfärbungen im Stomodäum und in den Malpighianlagen sind sehr prominent. Jedoch knospen die Malpighianlagen nicht aus, vermutlich bleiben die *Kr* gefärbten Zellen stattdessen im Hinterdarm integriert (Abb. 30). Obwohl also *Kr* Protein exprimiert wird, finden sich starke phänotypische Defekte in der Segmentierung und in der Ausbildung der Malpighigefäße; dies deutet darauf hin, daß die Funktionsstörung essentielle Strukturen des Proteins betrifft.

Sieht man von der Möglichkeit einmal ab, daß das *Kr* Gen in diesen Mutanten von zwei unabhängigen Mutationsereignissen betroffen ist, so muß angenommen werden, daß die Mutation im Protein sowohl zu seiner Dysfunktionalität wie zu der atypisch starken Akkumulation führt.

Von den übrigen Mutanten dieser Gruppe weist keine eine stark atypische *Kr* Proteinverteilung auf. Sie gehören alle zur Klasse der schwachen (bzw. intermediären) Allele, was auf den Besitz von Proteinrestfunktion schließen läßt. Der Vergleich mit den phänotypischen Störungen in den Malpighigefäßen ist dabei aufschlußreich.

In Kr^V Embryonen, die den stärksten Segmentierungsphänotyp in der Klasse der schwachen Allele ausbilden, findet sich eine deutliche Reduktion der Malpighigefäße. Die *Kr* Färbung ist extrem schwach, daher

darf man vermuten, daß die beobachteten phänotypischen Defekte auf zu geringe Produktion eines funktionalen *Kr* Proteins zurückzuführen sind, möglicherweise ist eine regulatorische Region im *Kr* Gen von der Mutation betroffen.

IV. Diskussion

1. Zu den Untersuchungen am *Kr* Protein

Mit Hilfe der Antikörper konnte nachgewiesen werden, daß das *Kr* Protein im Zellkern lokalisiert ist. Dieses Ergebnis war aufgrund der Homologie von *Kr* zum Transkriptionsfaktor TF IIIA in *Xenopus* und zum Transkriptionsaktivator der Alkoholdehydrogenase (ADR 1) in Hefe durchaus zu erwarten gewesen (Rosenberg et al., 1986; Hartshorne et al., 1986).

Allerdings vermag die "Fingerstruktur" nicht nur DNA zu binden: Im Falle von TF IIIA wurde gezeigt, daß das Protein sowohl an DNA (nämlich an das 5S rRNA Gen) wie auch an RNA (nämlich an die 5S rRNA) bindet (Honda und Roeder, 1980). Als "Fingerprotein" könnte *Kr* nun im Prinzip ebenfalls die Fähigkeit besitzen, RNA zu binden. Die Färbungen mit den *Kr* Antikörpern zeigen allerdings kein Signal im Cytoplasma; daher ist anzunehmen, daß, selbst wenn *Kr* seine Funktion (auch) über RNA-Bindung ausüben sollte, diese primär auf den Kern beschränkt ist.

Wie beschrieben, liegt das *Kr* Protein im Kern nicht in einer homogenen Verteilung vor. Im Interphasekern ist ein "Punktmuster" der *Kr* Proteinverteilung sichtbar, das während der Mitose einer diffusen cytoplasmatischen Färbung weicht. Eine solche Veränderung der Proteinverteilung im Verlauf des Zellzyklus wurde ebenfalls für das *caudal* (*cad*) Protein beschrieben (MacDonald und Struhl, 1986). MacDonald und Struhl interpretieren ihre Beobachtungen dahingehend, daß das *cad* Protein während der Interphase mit spezifischen "sites" auf den Chromosomen assoziiert ist und daß während der Mitose das *cad* Protein von den Chromosomen verdrängt wird. Ähnliches könnte für das *Kr* Protein zutreffen.

Da das *Kr* Protein im Kern akkumuliert, wurde nach einer Signalsequenz für den Kernimport innerhalb der Proteinsequenz gesucht. Die Peptidsequenz, die als NLS für das *Kr* Protein in Frage kommt, weist eine starke Homologie zu den NLS der "large T Antigene" von SV 40 und Polyoma auf, ja läßt sich als aus beiden Sequenzen zusammengesetzt beschreiben: Die ersten fünf Aminosäuren (vom N-Terminus gerechnet) sind Polyoma, die letzten drei SV 40 homolog (R). Die *Kr* Sequenz unterscheidet sich, abgesehen davon, daß es in dieser Weise zusammengesetzt ist, in zwei Aminosäureresten von den viralen NLS. Zwischen Pro und Lys in der Polyomasequenz liegt in *Kr* der Aminosäurerest Ala, im SV 40 homologen Anteil ist Val gegen Leu ausgetauscht. Diese Unterschiede der *Kr* Sequenz gegenüber den bekannten NLS scheinen ihre Funktion nicht gravierend zu beeinträchtigen, wie die starke Akkumulation des *Kr* Peptid-Rinderserumalbumins im Kern zeigt. Dennoch kann aus diesen Beobachtungen nicht geschlossen werden, daß diese Sequenz für den Kerntransport des *Kr* Proteins (allein) verantwortlich ist: Zum einen haben Roberts et al. (1987) nachgewiesen, daß die Aktivität eines NLS von seiner Position innerhalb des Proteins abhängig ist; so kann es bei Lokalisation in einer hydrophoben Domäne durchaus maskiert sein. Zum anderen, dies zeigt das Polyoma "large T Antigen" (Kalderon et al., 1984), mag es mehrere NLS in einem Protein geben, zwischen denen kooperative Effekte möglich sind (Roberts et al., 1987). Ob ähnliches auch für das *Kr* Protein gilt, soll mit Hilfe von *in vitro* Mutageneseexperimenten geklärt werden.

Die Ähnlichkeit des *Kr* Proteins mit TF IIIA beruht auf einer Sequenzhomologie, die in der DNA-bindenden Domäne des Transkriptionsfaktors liegt; diese Region ist, Modellvorstellungen zufolge, in tandemrepetierte

"finger loops" gefaltet, die durch flexible "finger links" verbunden sind (Miller et al., 1985). Im Gegensatz zu TF IIIA besitzen diese "finger links" im *Kr* Protein eine nahezu identische Aminosäuresequenz. Die Ergebnisse, die mit Hilfe der "finger link" Antikörper erzielt wurden, haben gezeigt, daß eine ganze Anzahl von Kernproteinen in *Drosophila* und anderen Spezies dieses Epitop besitzen; zumindest einige der Antigene sind mit Chromatin assoziiert.

Sowohl in *Drosophila* wie in Maus und *Xenopus* wurden unter "low stringency" Bedingungen *Kr*-homologe Gene isoliert; die Sequenzanalyse zeigt, daß in allen drei bisher untersuchten Fällen die Homologie zu *Kr* neben der "finger loop" Struktur insbesondere in der "finger link" Sequenz liegt (Schuh et al., 1986; Chowdhury et al., 1987; R).

Unter Zugrundelegung der folgenden Konsensussequenz für den "finger link", nämlich Thr-Gly-Glu-Lys-Pro-Phe/Tyr-X, lassen sich die bisher bekannten Fingerproteine in drei Gruppen zusammenfassen: Proteine, in denen fast alle Finger durch den konservierten "link" verbunden sind (dazu gehören *Kr*, (Maus) Mkr 1 und Mkr 2) (Chowdhury et al., 1987), Proteine, in denen nur wenige Finger durch den konservierten "link" verbunden sind (so TF IIIA) und schließlich solche, die keinen derartigen "finger link" besitzen (*serendipity* (*sry*) *ß* und *sry* ; ADR 1 und *hb*)
(Vincent, 1986; Tautz et al., 1987).

Die starke Konservierung einer Proteinsequenz in der Evolution legt die Vermutung nahe, daß ihr funktionelle Relevanz zukommt. Welche Funktion der betrachteten "finger link" Sequenz innerhalb der Fingerproteine zukommen könnte, ist gegenwärtig noch unklar.

2. Die *Kr* Proteinexpression im Blastoderm

Für eine Diskussion der frühen Expression von *Kr* ist es sinnvoll, zunächst das Zusammenwirken der maternalen Segmentierungsgene bei der Etablierung der antero-posterioren Achse zu betrachten.

Die maternalen Gene lassen sich in drei Gruppen zusammenfassen, von denen jede einen spezifischen Aspekt des antero-posterioren Musters organisiert. Eine Gruppe von Genen ist für die Etablierung terminaler Strukturen an beiden Enden des Embryos verantwortlich; eine zweite organisiert das abdominale Muster, und *bcd* instruiert die Ausbildung anteriorer Strukturen; *exu* und *swa* dienen zur Lokalisation der *bcd*-Aktivität. Diese drei Gruppen lassen sich primär als in ihrer Funktion voneinander unabhängig betrachten; dies wurde aus der Additivität der Phänotypen in Doppel- und Tripelmutanten, in denen Mutanten von Genen der verschiedenen Gruppen miteinander kombiniert wurden, geschlossen (Nüsslein-Volhard et al. (zur Publikation eingereicht)).

Die nähere Betrachtung insbesondere der Anlagenplanverschiebungen in den einzelnen Mutanten zeigt jedoch, daß die drei Subsysteme durchaus - direkt oder indirekt - miteinander wechselwirken. So erfährt das Muster der *ftz* Expression, das Aufschluß über die Zahl und Lage der Segmentanlagen gibt, in den Mutanten verschiedener Klassen recht unterschiedliche Veränderungen: Bei Ausfall von posterioren Organisatorgenen kommt es nicht zu einer Verschiebung des Restmusters. Weder *tor* noch *bcd* breiten sich in den Wirkungsbereich der abdominalen Faktoren aus. Dagegen kommt es bereits in hypomorphen *bcd* Allelen zu einer drastischen Ausbreitung des Segmentmusters nach anterior. In amorphen *bcd* Allelen kommt es darüberhinaus zu einer Etablierung eines Telsons am anterioren Pol. Daraus läßt sich schließen, daß *bcd* sowohl eine negative Wirkung auf

die Ausbreitung des Segmentmusters wie auch einen stark "modifizierenden" Einfluß auf die *tor*-Aktivität ausübt (Frohnhöfer, 1987). In *tor* Embryonen kommt es nun ebenfalls zu einer Ausdehnung des Restmusters, wobei der Effekt posterior stärker ausgeprägt ist als anterior. So übt auch tor^+-Aktivität einen negativen Einfluß auf die Ausbreitung des segmentierten Musters aus. Der Vergleich des Musters von *exu* mit *tor exu* und *tor* Embryonen zeigt insbesondere, daß, solange *tor*-Aktivität vorhanden ist, nach posterior ausgebreitete *bcd*-Aktivität (durch *exu*) nur eine Kompression im Muster bewirkt (mit der Folge, daß z.T. Segmentfusionen im posterioren Abdomen auftreten können), daß aber nach Beseitigung der "blockierenden" tor^+-Aktivität eine massive Ausbreitung der Segmentanlagen, insbesondere nach posterior, erfolgt, die zum Verlust einer weiteren Anlage führt (PS12; 6. *ftz* Streifen).

Es scheint also dem Segmentmuster die Fähigkeit inhärent zu sein, sich auf Kosten der nicht segmentierten Anteile der Anlage auszubreiten (dies kann auch so gedeutet werden, daß für das Streifenmuster keine fixen Vorgaben bezüglich einer maximalen Periodenlänge zu gelten scheinen). bcd^+- und tor^+-Aktivität sind für dessen Eingrenzung verantwortlich. Darüberhinaus modifiziert *bcd* die Funktion der tor^+-Aktivität. Diese "Modifikation" bewirkt, daß die tor^+-Aktivität am anterioren Pol sich nicht wie die am posterioren Pol verhält. Eine Anzahl von Beispielen belegt dieses ungleichartige Verhalten: So dehnt sich in *tor* Embryonen das *ftz* Muster stärker nach posterior als nach anterior aus; in noch stärkerem Ausmaß gilt dies für *tor exu* Embyronen. Der Vergleich der *Kr* Expression in hypo- bzw. amorphen *bcd* Allelen gibt ebenfalls Hinweise. In hypomorphen *bcd* Allelen ist die *Kr* Expression bis auf mindestens 85% EL nach anterior ausgedehnt, während sie sich in amorphen Allelen auf 70% EL zurückzieht. Damit liegt am Vorderende eine Situation vor, wie sie z.B. in *osk* Embryonen am

posterioren Pol gegeben ist. Das anterior duplizierte Telson verhält sich also bezüglich seiner reprimierenden Wirkung auf die *Kr* Expression genauso wie das posteriore. In hypomorphen *bcd* Allelen vermag die anterior vorliegende *tor*$^+$-Aktivität nicht dieselbe Repression auszuüben. *bcd* könnte seine modifizierende Wirkung einerseits durch Einschränkung des Bereichs der *tor*$^+$-Aktivität erzielen, oder auch - ohne die räumliche Ausdehnung der *tor*$^+$-Aktivität zu verändern - durch Einschränkung oder "Maskierung" von deren Wirkmöglichkeiten.

Soweit zur Charakterisierung des (Zusammen-) Wirkens der maternalen Genprodukte bei der Etablierung der antero-posterioren Achse. Eine reiche Strukturierung des Embryos ist also bereits vorgegeben, wenn die Expression des Gap Gens *Kr* einsetzt. Im folgenden soll nun betrachtet werden, auf welche Weise die maternalen Genprodukte die Festlegung der Domänenstruktur von *Kr* steuern.

Die Analyse der Mutanten der drei Gruppen maternaler Segmentierungsgene hat gezeigt, daß alle einen negativen Einfluß auf die Expression von *Kr* ausüben. Die Repressionswirkung der terminalen Organisatorgene konnte dabei erst in Doppelmutanten (*osk tsl*, *bcd tsl*) wie auch durch Betrachtung der *tor* Mutante *RL3* nachgewiesen werden. Unter Hinzunahme der Kenntnisse über die Wechselwirkungen der maternalen Genprodukte untereinander lassen sich auch subtilere Veränderungen des *Kr* Proteinmusters verstehen:

- So bleibt die anteriore Grenze der *Kr* Expressionsdomäne in Mutanten der *osk*-Gruppe ungefähr in Wildtyp-Position, da sich *bcd* (und damit der negative Einfluß auf *Kr*) nicht deutlich nach poste-

rior ausdehnt. Dies stimmt mit molekularen Daten über die Verteilung von *bcd* in *osk* Mutanten überein (W. Driever, pers. Mitteilung).

- Umgekehrt kommt es zu einer Verschiebung beider Domänengrenzen - also auch der posterioren - nach anterior in *bcd* Mutanten, was sich auf die Ausbreitungstendenz der maternalen Abdominalfaktoren zurückführen läßt.
- Die Unterschiede in der *Kr* Domänenstruktur, die im Vergleich zwischen hypo- und amorphen *bcd* Embryonen zu beobachten sind, lassen sich, wie oben bereits ausgeführt, als Folge des Fehlens der "modifizierenden" Wirkung von *bcd* auf *tor* verstehen.

Da nun alle maternalen Gene, die mit der Organisation des antero-posterioren Musters betraut sind, einen ausschließlich negativen Einfluß auf die *Kr* Expression ausüben, legt sich als einfachste Modellvorstellung nahe, daß die Aktivierung der *Kr* Transkription durch einen ubiquitär vorliegenden positiven Transkriptionsfaktor besorgt wird, und daß es durch anteriore, posteriore und terminale "Organisator"gene zu einer Restriktion der *Kr* Expression auf die zentrale Region im Embryo kommt. *Kr* Expression würde also zum "Grundzustand" einer jeden Blastodermzelle gehören, käme es nicht zu einer Repression durch die maternalen Organisatoren von den Polen her. Ein solcher Mechanismus der Regulation von *Kr* setzt voraus, daß der negative Einfluß durch die maternalen Genprodukte in der zentralen Region verschwindet. Für *bcd* konnte eine gradiierte Verteilung des Proteins, mit einem Maximum am anterioren Pol und allmählichem Abklingen zur Mitte des Embryos hin, gezeigt werden (W. Driever, persönl. Mitteilung). Für die abdominalen Faktoren liegen noch keine molekularen Daten vor.

Zu diesem Modell der *Kr* Aktivierung durch die maternalen Segmentierungsgene ist folgendes zu bemerken:

a) Prinzipiell wäre es denkbar, daß ein regionsspezifischer Aktivator die *Kr* Transkription in der zentralen Domäne anstellt. Aufgrund der Phäno-typen der bisher bekannten maternalen Segmentierungsgene konnte von vornherein davon ausgegangen werden, daß ein solcher für *Kr* nicht gefunden werden würde. Der Phänotyp eines regionsspezifischen Aktivators von *Kr* müßte regionsspezifische Ausfälle im mittleren Bereich des Segmentmusters aufweisen, also dem *Kr* Phänotyp ähnlich sein. Die einzige bislang bekannte maternale Mutante, die in schwächeren Ausprägungen ihres Phänotyps solche Störungen aufweist, ist *RL3* ; allerdings kommen die Störungen im Segmentmuster dieser Mutante durch ektopische Expression von tor^{+} -Aktivität zustande.

b) Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung der *Kr* Expression ist in dem Segmentierungsmodell von Meinhardt (1986) formuliert: Danach ist ein maternaler Morphogengradient über die gesamte Eilänge ausgebreitet. In verschiedenen Konzentrationsbereichen des Gradienten kommt es zu einer regionalen, je spezifischen Aktivierung von Gap Genen. Angewandt auf *Kr* würde dies bedeuten, daß niedrige Morphogenkonzentrationen zu einer Aktivierung von *Kr* führen. Unter amorphen Bedingungen für das maternale Morphogen (seien es es nun anteriore oder abdominale Organisatoren oder beide zusammen) dürfte also *Kr* nicht mehr aktiviert werden können. Die vorgelegten Daten zeigen aber gerade das Gegenteil und schließen damit einen solchen Mechanismus der Aktivierung von *Kr* durch die maternalen Segmentierungsgene aus.

Es stellt sich nun im weiteren die Frage, ob die maternalen Faktoren direkt ihren reprimierenden Einfluß auf die *Kr* Expression ausüben oder indirekt

über eine Aktivierung anderer Gap Gene, die ihrerseits einen reprimierenden Einfluß auf die *Kr* Transkription ausüben. Für die abdominale Situation läßt sich folgendes festhalten: Da sich in *osk* Embryonen die *Kr* Proteindomäne sehr stark nach posterior ausdehnt (bis ungef. 30% EL), in *kni*- Embryonen demgegenüber sehr schwach (2-4 Zellen), kann *kni*+ Produkt nicht für die Festlegung der posterioren Grenze der *Kr* Proteindomäne verantwortlich sein. Allerdings besteht eine Diskrepanz zwischen den Transkript- und den Proteindaten für die *Kr* Expression in *kni*- Embryonen: Während die Transkriptdomäne gegenüber dem Wildtyp deutlich (6-8 Zellen) nach posterior ausgedehnt ist, ist die Proteindomäne schwächer nach posterior ausgedehnt (2-4 Zellen). Dieser Befund könnte in folgender Weise gedeutet werden: Die *Kr* Expression unterliegt zwar einer transkriptionellen Kontrolle durch *kni*+-Aktivität, zusätzlich wird die *Kr* Proteinexpression aber auf posttranskriptioneller Ebene durch weitere abdominale (maternale oder zygotische) Faktoren reguliert. - Für die anteriore Situation kann folgendes festgehalten werden: *hb* besitzt eindeutig einen negativen Einfluß auf die *Kr* Expression. *hb* hat eine maternale Komponente, und bereits zum Zeitpunkt des Transkriptionsbeginns von *Kr* liegt *hb* Protein vor. Da die *Kr* Proteindomäne in *hb*- Mutanten nur bis auf 67 % EL nach anterior reicht, muß allerdings davon ausgegangen werden, daß noch weitere Faktoren im anterioren Bereich vorliegen, die die *Kr* Expression unterdrücken. Die Fähigkeit von *hb*, die *Kr* Expression negativ zu beeinflussen, reicht allerdings nicht bis zur vollständigen Unterdrückung, wie die Beispiele *exu* und *stau exu* zeigen. So dehnt sich in *exu* Embryonen die *Kr* Proteindomäne etwas nach anterior in die anteriore *hb* Proteindomäne hinein aus, und in *stau exu* Embryonen kommt es zu einem sehr viel weiter gehenden Überlappen der Proteindomänen von *Kr* und *hb*. Auch anterior ist also eine Beteiligung

weiterer (maternaler oder zygotischer) Faktoren bei der Suppression der *Kr* Expression wahrscheinlich.

Für die bisherige Diskussion ist die Frage leitend gewesen, in welcher Weise die Domänenstruktur der *Kr* Expression etabliert wird. Wie gezeigt werden konnte, geht dies vermutlich durch eine ausschließlich negative Kontrolle einer sonst ubiquitären *Kr* Transkription vor sich, sei es durch die maternalen Faktoren direkt, sei es durch die übrigen Gap Gene vermittelt. Demgegenüber wird die anteriore *hb* Proteindomäne primär durch die positive Kontrolle durch *bcd* festgelegt (Tautz, pers. Mitteilung).
Im folgenden soll nun die Funktion der Gap Gene *Kr* und *hb* im Segmentierungsprozeß thematisch sein.

Bei Betrachtung der Phänotypen von *hb*, *Kr* und *kni* fällt auf, daß die Ausfallbereiche im Segmentmuster der Mutanten miteinander überlappen: Sowohl in amorphen *hb* wie in amorphen *Kr* Embryonen fehlt der Thorax; *kni*$^-$ und *Kr*$^-$ Embryonen ist das Fehlen des anterioren Abdomen gemeinsam. Diese überlappenden Ausfallbereiche deuten darauf hin, daß möglicherweise ein Zusammenwirken benachbarter Gap Gene für die Organisation der Segmentierung erforderlich ist (Abb. 31).
Einige der bisher referierten Daten stützen diese Deutung. So zeigt der Vergleich von Phänotyp und *Kr* Proteinexpression in *osk bcd* Embryonen, daß *Kr* per se nicht imstande ist, Segmentierung zu instruieren. In analoger Weise lassen sich die Ergebnisse an *RL3* Mutanten interpretieren, in denen *Kr* Protein gänzlich fehlt: Obwohl *hb* Protein exprimiert wird, kann das normale Muster der *ftz* Proteinexpression im anterioren Bereich nicht mehr ausgebildet werden. Auch *hb* Expression reicht also nicht hin, z.B. die ersten

beiden *ftz* Streifen und damit das Segmentierungsmuster im gnathalen und thorakalen Bereich zu etablieren.
Diese Ergebnisse zeigen, daß die Gap Gene der Mithilfe weiterer Gene bedürfen, um innerhalb ihrer eigenen Expressionsdomäne den Segmentierungsprozeß zu instruieren.

Da es nun gute Gründe gibt anzunehmen, daß benachbarte Gap Gene zusammmenwirken müssen, um im eigenen und dem jeweils benachbarten Bereich Segmentierung zu instruieren, stellt sich die Frage, welcher Mechanismus einem solchen Zusammenwirken zugrunde liegt. Meinhardt (1986) schlägt in seinem Modell der Segmentierung folgendes vor: Die Gap Gene ("Kardinalgene") werden in aneinander angrenzenden, nicht überlappenden Domänen exprimiert. Die Domänengrenzen werden durch eine wechselseitige negative Regulation der Grenzpartner scharf gehalten; dies ist deshalb erforderlich, weil es die Domänen g r e n z e n sein sollen, die für die Organisation des Doppel-Segmentmusters der Paarregelgene instruktiv sind, und nicht die Domänen selbst. Diese Modellvorstellung gibt eine mögliche Erklärung für das Überlappen der Deletionsbereiche der Gap Gene, muß dabei aber sehr hohe Ansprüche an die Exaktheit der Grenzziehung zwischen den Domänen stellen.

Folgende Beobachtungen lassen nun fraglich erscheinen, ob den Domänengrenzen tatsächlich die von Meinhardt postulierte Qualität zukommt.
Zunächst zeigen selbst im Wildtyp die Proteindomänen, insbesondere die von *Kr*, keine scharfen Grenzen (1); die Analyse von Mutanten zeigt darüberhinaus, daß die *hb* und die *Kr* Proteindomäne durchaus signifikant überlappen können (2). Schließlich belegen die Proteinmuster in einzelnen

Mutanten, daß die Gap Gen-Grenzen kein festes Raster für die Expression der Paarregelgene vorgeben (3).

(1) Die Verteilung von *Kr* und auch *hb* Protein im Wildtypembryo ist zu keinem Zeitpunkt scharf begrenzt, vielmehr zeigt sich im Grenzbereich eine gradiierte Abnahme.

(2) Die Analyse bestimmter maternaler Mutanten zeigt nun, daß (unter bestimmten pathologischen Bedingungen) die Proteindomänen von *Kr* und *hb* stark überlappen können, was gegen eine inhärente Fähigkeit der beiden spricht, sich wechselseitig vollständig zu unterdrücken. (Dies bedeutet aber auch, daß die Domänenstruktur, die im Wildtypembryo vorhanden ist, nicht auf ein freies "Kräftespiel" von *hb* und *Kr* zurückführbar ist, sondern durch maternale Einflußnahme mitverursacht wird.)

In *exu* Embryonen überlappen die Proteindomänen von *Kr* und *hb* stärker als im Wildtyp; die anteriore *hb* Domäne ist geringfügig nach posterior ausgedehnt, während die anteriore Grenze der *Kr* Domäne nach vorn verschoben ist.

Augenfälliger wird diese Unfähigkeit von *hb* und *Kr*, sich wechselseitig völlig zu unterdrücken, in *stau exu* Embryonen: Zwar zeigt sich im Phänotyp der Mutante eine beträchtliche Variabilität, dennoch ist eine deutliche Tendenz von *Kr* wie *hb* Protein erkennbar, das ganze Ei auszufüllen. Im übrigen werden in diesen Embryonen, obwohl keine scharfe Trennung der Proteindomänen von *Kr* und *hb* mehr vorliegt, dennoch *ftz* Streifen ausgebildet, und selbst die am stärksten gestörten Phänotypen weisen segmentierte Elemente (Pro- und Mesothorax) auf; selbst eine gänzliche "Vermengung" von *hb* und *Kr* Protein scheint also die Bildung segmentierter Elemente nicht auszuschließen.

(3) Während des mittleren Blastoderms sind die Expressionsmuster von *hb*, *Kr* und *ftz* Protein im Wildtyp in folgender Weise aufeinander bezogen: Die

anteriore Grenze der *Kr* Domäne fällt mit der anterioren Grenze des zweiten *ftz* Streifens (PS4) zusammen, und die posteriore Grenze reicht bis an die anteriore Grenze des vierten *ftz* Streifens (PS8) heran; der dritte *ftz* Streifen liegt somit vollständig in der *Kr* Domäne. Die posteriore Grenze der anterioren *hb* Domäne liegt im zweiten *ftz* Streifen.

In verschiedenen Mutanten lassen sich nun gegenüber diesen für den Wildtyp charakteristischen Verhältnissen Abweichungen beobachten.

So liegt z.B. in *exu* Embryonen der vierte *ftz* Streifen im allgemeinen vollständig im Bereich der *Kr* Domäne. Der zweite *ftz* Streifen liegt in *exu* und *tor exu* Embryonen vollständig im Bereich der *hb* Domäne und nur noch partiell innerhalb der *Kr* Domäne. Offenbar können also die *ftz* Streifen gegenüber den Grenzen der *hb* bzw. der *Kr* Proteindomäne durchaus unterschiedliche Positionen einnehmen. Es ist daher nicht wahrscheinlich, daß die Grenzen als solche für die Festlegung dieser Position verantwortlich sind; jedenfalls bilden sie kein festes Raster für die Expression der Paarregelgene.

Nach den angeführten Beobachtungen scheint es also problematisch, die Instruktion des weiteren Segmentierungsprozesses speziell als eine Leistung scharfer Domänengrenzen aufzufassen. Man muß also fragen, ob das Zusammenwirken der Gap Gene nicht auch in anderer Weise erfolgen kann.

In diesem Zusammenhang ist auf zwei weitere Probleme einzugehen:

Vergleicht man die Proteindomäne von *Kr* im Blastoderm mit dem phänotypisch sichtbaren Ausfall im Segmentmuster amorpher *Kr* Embryonen, so zeigt sich eine auffällige Diskrepanz: Während *Kr* Protein nur in den Parasegmenten 4-7 exprimiert ist, fehlen im Kutikulamuster die Segmente T1-A5 (was den Parasegmenten 3/4-10/11 entspricht).

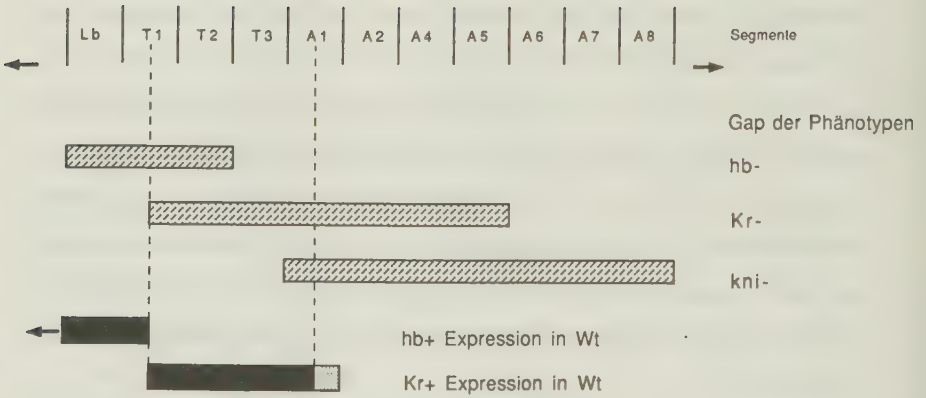


Abb. 31 Schematische Darstellung der Phänotypen der gap Mutanten *hb*, *Kr* und *kni* (a) und der Wildtyp-Expressionsdomänen von hb^+ und Kr^+ Transkript (b).

T1-T3, Thorakalsegmente, A1-A8, Abdominalsegmente; Lb, Labium. Ausfallbereiche im Segmentmuster sind durch schraffierte Balken, die Expressionsdomänen durch schwarze Balken repräsentiert; die Schwankungsbreite der Expression ist gepunktet wiedergegeben.

Wie ist eine solche Differenz zu erklären?

Eine mögliche Erklärung liefert wiederum das oben erwähnte Modell von Meinhardt (Abb. 32). Die Expressionsdomänen der Gap Gene bilden danach aneinander angrenzende, nicht überlappende "kardinale Regionen". Die scharfen Domänengrenzen instruieren die nachfolgenden Segmentierungsprozesse symmetrisch zu beiden Seiten und organisieren dabei insgesamt einen Bereich von der Größe einer Expressionsdomäne.

Fällt nun ein Gap Gen aus, so hat der damit eintretende Ausfall zweier Grenzen zur Folge, daß ein Bereich von der Größe zweier Domänen deletiert wird. Der Ausfall ist mithin doppelt so groß wie die Domäne der Expression des betreffenden Gens. Daraus ergibt sich dann weiter, daß die phänotypischen Ausfälle benachbarter Gap Gene sich um genau eine "Domänenlänge" überschneiden.

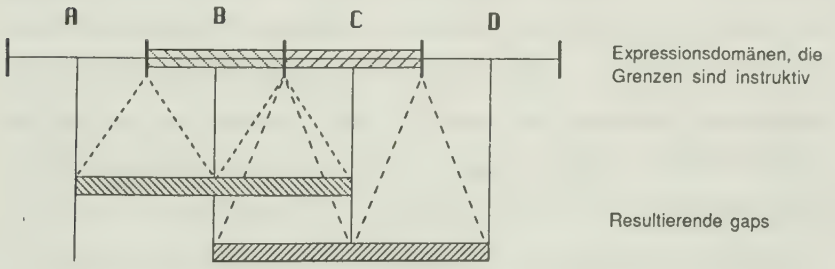


Abb. 32 Veranschaulichung der gap Genfunktion im Segmentierungsmodell von Meinhardt (1986).Erläuterung s. Text.

Das Modell sagt also voraus, daß sich der phänotypische "Gap" in symmetrischer Weise nach beiden Seiten über die Expressionsdomäne hinaus erstreckt. Tatsächlich jedoch - und dieser Umstand scheint bisher

vernachlässigt worden zu sein - dehnt sich im Falle von *Kr* der phänotypische "Gap" nur in e i n e Richtung, nämlich nach posterior, über die Expressionsdomäne hinaus aus; anterior hingegen stimmen die Grenzen von Expression und "Gap" ungefähr überein. (Für *hb* gilt im übrigen folgendes: Die anteriore *hb* Proteindomäne reicht vom anterioren Pol bis PS3; im Segmentmuster kommt es zu einer Deletion des dritten Gnathalsegments und des gesamten Thorax (also von PS 2/3 bis PS 5/6)).

Dem Modell von Meinhardt zufolge ist nun weiter ein Gap Gen für die Segmentierung in dem ihm zugeordneten Bereich notwendig, und es wäre zu erwarten, daß im Falle des Fehlens des Gens im gesamten Bereich des zugehörigen phänotypischen "Gaps" keine Segmentierung erfolgen kann.

Die Analyse der *Kr* Proteinexpression in *BicD exu* Embryonen zeigt jedoch, daß dies nicht notwendig der Fall ist. *BicD exu* Embryonen besitzen einen bicaudalen Phänotyp mit besonders hoher abdominaler Segmentzahl; es werden bis zu 7 Abdominalsegmente in spiegelbildlicher Verdopplung ausgebildet (A8-A2//A2-A8). In diesen Embryonen ist jedoch *Kr* Protein nicht nachweisbar. Mithin scheint die Ausbildung von anterior abdominalen Segmenten auch ohne *Kr*- Aktivität möglich zu sein. Dies läßt darauf schließen, daß der Ausfall anteriorer Abdominalsegmente (die in dem Bereich des "Gaps" liegen, der über die *Kr* Proteindomäne im Wildtyp hinausreicht) in amorphen *Kr* Embryonen auf sekundäre Folgen des Fehlens von *Kr* zurückzuführen ist und entsprechend unter bestimmten Bedingungen kompensiert werden kann.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß es der Interaktion der Gap Gene bedarf, um das Segmentmuster der Paarregelgene zu etablieren. Dafür scheint in jedem Fall wesentlich zu sein, daß eine Abfolge benachbarter Domänen vorliegt, in denen je verschiedene Gap Genprodukte exprimiert

sind und daß somit ein definiertes Nebeneinander distinkter Qualitäten geschaffen wird. Ob es jedoch gerade scharfe Grenzen zwischen derartigen Domänen sind, die als solche (in welcher Weise auch immer) die Paarregelgenexpression instruieren, muß nach den angeführten Untersuchungsergebnissen fraglich erscheinen. Ein Erklärungsversuch hat im übrigen nicht nur zu berücksichtigen, daß es beim Fehlen eines Gap Gens zu einem weit größeren Ausfall im Segmentmuster kommt als es der Ausdehnung der Expressionsdomäne im Wildtypanlagenplan entspricht, sondern insbesondere, daß sowohl in *Kr* wie in *hb* diese Ausbreitung der Störung nur nach posterior erfolgt. Weitergehende und konkretere Aussagen über die Funktionsweise der Gap Gene sind auf der Grundlage der erarbeiteten Daten nicht möglich; dafür scheint es erforderlich, sehr viel eingehender die Korrelation zwischen den Expressionsdomänen von Gap Genen und Paarregelgenen zu studieren, wobei der Aspekt der zeitlichen Entwicklung des Musters besonders zu berücksichtigen ist.

3. Die *Kr* Proteinexpression nach dem Blastoderm

In späteren Stadien der Embryogenese wird das *Kr* Protein in einer Anzahl von Geweben exprimiert: in der Amnioserosa, den Malpighianlagen, in Vorläuferzellen der somatischen Muskulatur und im sich entwickelnden Nervensystem, wobei bemerkenswert ist, daß drei wichtige neurogene Regionen im Embryo, die procephale, die ventrale und die stomodäale, *Kr*-positive Zellen aufweisen. Nimmt man Protein- und Transkriptdaten zusammen, so läßt sich sagen, daß die Expression von *Kr* in den meisten Fällen zu einem frühen Zeitpunkt der Entstehung der Organanlagen bzw. Gewebe einsetzt (vgl. Knipple et al., 1985). So läßt sich die Expression in den Malpighianlagen bis ins Blastoderm zurückverfolgen, wo eine "Kappe" von Zellen am posterioren Pol *Kr* Transkript akkumuliert. Ähnliches gilt für das Stomodäum-spezifische Signal, das aus einer Gruppe von Zellen am anterioren Pol hervorgeht, die während der Gastrulation *Kr* Transkript akkumulieren, und wohl auch für die ventrale neurogene Region (Transkriptakkumulation im ausgestreckten Keimstreif). Demgegenüber erscheint das *Kr* Signal in der Entwicklung der Amnioserosa relativ spät, nämlich erst im fast ausgestreckten Keimstreif, während *zen* bereits die Amnioserosaanlage im Blastoderm, einen dorsomedial gelegenen Streifen von Zellen, markiert (Doyle et al., 1986). Der Expression von *Kr* in den verschiedenen Geweben im Wildtypembryo konnten - soweit untersucht - phänotypische Defekte in Kr^- Mutanten zugeordnet werden.

So ist in Kr^- Mutanten die Organisation des ventralen Nervensystems stark gestört, und die Malpighigefäße werden überhaupt nicht ausgebildet (Gloor, 1954). Die Schwere der phänotypischen Defekte deutet darauf hin, daß *Kr* eine frühe, essentielle Funktion in der Entwicklung dieser Gewebe zukommt. Das Fehlen der Malpighigefäße in amorphen *Kr* Embryonen geht,

wie Janning et al. (persönliche Mitteilung) zeigen konnten, darauf zurück, daß die Zellen, die Malpighigefäße ausbilden sollten, im Hinterdarm integriert bleiben. Dieser Befund zeigt deutlich, daß *Kr* eine essentielle Bedeutung für die Ausdifferenzierung der Malpighigefäße zukommt. Bei den Störungen der Organisation im Nervensystem sind Sekundäreffekte, die auf die Segmentierungsstörung zurückgehen, nicht auszuschließen, ja sogar wahrscheinlich. Die weitere Analyse wird sich daher auf jüngere Entwicklungsstadien der Neurogenese konzentrieren.
Da in amorphen *Kr* Embryonen durchaus eine Amnioserosa ausgebildet wird, kann *Kr* in diesem Gewebe allenfalls eine "modifizierende" Funktion besitzen, die der Differenzierungsentscheidung nachgeordnet ist; dies korrespondiert mit dem relativ späten Zeitpunkt der Expression.

Für das Segmentierungsgen *Kr* war ein komplexes raumzeitliches Muster der Expression nach dem Blastoderm nicht eigentlich erwartet worden. Von ähnlicher Komplexität ist, soweit bislang untersucht, nur das späte Expressionsmuster von *hb*; die übrigen molekular untersuchten Segmentierungsgene scheinen in ihrer späten Expression auf das Nervensystem beschränkt zu sein (*Ultrabithorax* (*Ubx*)(White und Wilcox, 1984), *ftz* (Carroll und Scott, 1985; Hiromi, 1985), *engrailed* (*en*) (Dinardo, 1985), *even skipped* (*eve*) (Frasch, 1987)), sieht man von *cad* ab, das zusätzlich im hinteren Mitteldarm, den Malpighigefäßen und Teilen der Genitalimaginalscheiben gefunden wird (MacDonald und Struhl, 1986). Über mögliche phänotypische Defekte, die diesen späten Expressionsmustern korrespondieren könnten, liegen außer für die Expression von *en* im Nervensystem (Lawrence und Johnston, 1984) keine publizierten Daten vor.

Im Embryo werden also dieselben regulatorischen Gene nicht nur für die Etablierung des Segmentmusters, sondern auch für spätere Prozesse der Entwicklung, Organogenese bzw. Cytodifferenzierung benutzt. Diese Wiederverwendung von regulatorischen Faktoren - denn solche sind ja offensichtlich etliche der Segmentierungsgene - mag ihren Grund darin haben, daß zwar viele regulatorische Aufgaben zu erfüllen sind, aber nur wenige "gute" Regulatorproteine zur Verfügung stehen.

Die Regulation der späten *Kr* Expression konnte bisher nur in Ansätzen untersucht werden: *Kr* steht unter der mehr oder weniger direkten Kontrolle von Genen, die die dorso-ventrale Achse des Embryos organisieren (Amnioserosa-, Muskelexpression), wie auch unter dem Einfluß von Genen, die in den terminalen Regionen des Embryos aktiv sind. Wie an der *Kr* Expression in Stomodäum und Malpighianlage gezeigt werden konnte, wird hier das Gap Gen *Kr* von einem homöotischen Gen, nämlich *fkh*, positiv kontrolliert; die hierarchische Ordnung in der Genregulation ist in diesem Fall also gegenüber derjenigen im Segmentierungsprozess umgekehrt.

Für die Untersuchung der cis-ständigen Kontrollelemente der *Kr* Expression war die Analyse von *Kr* Mutanten aufschlußreich, wie auch der Vergleich zwischen Transkript- und Proteinverteilung im Wildtypembryo. Da dieser Vergleich eine Diskrepanz zwischen der Akkumulation von *Kr* Transkript und *Kr* Protein insbesondere im Nervensystem aufgezeigt hat, wurde geschlossen, daß die Akkumulation von *Kr* Protein nicht nur durch die Regulation der Transkription ("upstream" Kontrollelemente), sondern zusätzlich auf posttranskriptioneller Ebene gesteuert wird.

Zunächst zur "upstream" Transkriptionskontrolle: Wie die Analyse von Kr^{21} gezeigt hat, sind die Promoterregionen für frühe und späte *Kr*-Transkription voneinander separiert. Eine solche Trennung der Kontrollregionen mag einen schnellen Wechsel zwischen "off" und "on states" der Transkription gerade beim Übergang zwischen "frühem" und "spätem" Expressionsmuster während des Blastoderms erleichtern: Man denke an die posteriore Region, wo bis zum mittleren Blastoderm die *Kr* Expression (*tor*-abhängig bzw. *osk*-abhängig) unterdrückt ist und wo es dann rasch zu einer (*fkh*-abhängigen) Transkriptakkumulation kommt.
Für eine weitere Untergliederung der Kontrollregion der späten Transkription spricht die Beobachtung, daß in Kr^{62} von allen späten Elementen der Expression insbesondere die Malpighianlage betroffen ist. Die Störung könnte dabei sowohl innerhalb der Kontrollregion für die späte Expression liegen (gewebespezifischer Promoter), wie auch außerhalb (gewebespezifischer "Enhancer").

Was die posttranskriptionelle Kontrolle anbetrifft, so stützen die bisher gesammelten Daten einen Mechanismus der "Spleiß"-Kontrolle, wie er sich zunächst nahezulegen scheint, nicht. Zum einen ist im "Northernblot" nach dem Blastoderm gespleißtes Transkript nicht mehr nachweisbar (Nachweisgrenze ungef. 5%), zum anderen ist die Intron-haltige RNA - *in vitro* - durchaus translatierbar und könnte im Prinzip funktionelles *Kr* Protein produzieren.
Folgender Mechanismus einer Translationskontrolle stellt nun eine attraktive Alternative zur "Spleiß"-Kontrolle dar; er wurde für die mRNA des Hefe GCN4 Faktors gezeigt (Mueller und Hinnebusch, 1986) und könnte auch für *Kr* zutreffen: In der 5´ nichttranslatierten "leader" Sequenz der GCN4 mRNA liegen mehrere kurze offene Leseraster ("open reading frames"

(ORF)), mit deren Hilfe die Translation dieser mRNA moduliert wird; werden diese ORF deletiert, so kommt es zu einer konstitutiven Translation des GCN4 Proteins. Im Rahmen der "scanning" Hypothese für die Translationsinitiation bei Eukaryonten kann dieses Ergebnis mechanistisch erklärt werden. Nach diesem Modell würde der Präinitiationskomplex vom 5´ Ende her an der mRNA entlang"scannen", bis ein geeignetes AUG gefunden wird. Die vielen "upstream" gelegenen AUG könnten nun die Effizienz der Initiation am eigentlichen Translationsstart erniedrigen. Die Translationsrate könnte gesteigert werden, indem dieses "Scanning", etwa durch die Bindung anderer trans-aktiver Faktoren an die "leader" Sequenz, unterbunden wird und so eine Initiation am eigentlichen Translationsstart favorisiert wird. Im Intron der *Kr* Sequenz findet sich nun "upstream" vom Initiationskodon, das in den großen ORF des *Kr* Proteins führt, eine Anzahl kurzer ORF in verschiedenen Leserastern. Prinzipiell könnte der für GCN4 beschriebene Mechanismus auch bei der Translation der *Kr* Intron mRNA Anwendung finden.

In den "leader" Sequenzen von *cad* und *Ace* (Acetylcholinesterase) wur-den ebenfalls solche kurzen ORF gefunden (MacDonald und Struhl, 1986; Hall und Spierer, 1986).

Man ist nun versucht, die anomale Proteinakkumulation in Kr^9 Mutanten mit einem Versagen posttranskriptioneller Regulation in Zusammenhang zu bringen. Für das Phänomen der pathologischen Akkumulation von *Kr* Protein in diesen Mutanten sind jedoch alternative Interpretationen denkbar. So könnte das dysfunktionale *Kr* Protein nicht dem normalen Protein"turnover" unterworfen sein, es könnte aber auch eine negative Feedbackregulation außer Funktion gesetzt sein..

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression des Genprodukts von *Krüppel* (*Kr*), einem Segmentierungsgen der "Gap" Klasse in *Drosophila melanogaster*, und deren Regulation und Funktion während der Embryogenese untersucht.

Kr-spezifische cDNA Sequenzen wurden in einen bakteriellen Expressionsvektor eingeschleust, der die bakterielle Synthese eines *Kr* Fusionsproteins erlaubte. Dieses wurde als Immunogen zur Gewinnung von Anti-*Kr* Protein-Antikörpern verwendet.

Injektion von mRNA, deren *in vitro* translatiertes Produkt von *Kr* Antikörpern immunpräzipitiert wird, normalisierte *Kr* mutante Embryonen. Damit wurde gezeigt, daß die *Kr* Antikörper gegen das biologisch aktive *Kr* Protein gerichtet sind.

Das *Kr* Protein ist im Kern lokalisiert. Eine 8 Aminosäuren lange Peptidsequenz innerhalb des *Kr* Proteins reicht aus, um Proteine in den Kern zu transportieren, und stellt möglicherweise ein Kerntransportsignal für das *Kr* Protein dar. Das *Kr* Protein enthält ferner die Modellvorstellungen zufolge DNA-bindende "Fingerstruktur". Innerhalb dieser sind die Aminosäuren, die die einzelnen "Finger" verbinden ("finger links"), konserviert. Antikörper, die gegen "finger link" spezifische Sequenzen gerichtet sind, erkennen sowohl in *Drosophila* wie in Vertebraten eine Anzahl von nukleären und möglicherweise mit Chromatin assoziierten Antigenen.

Die Regulation der *Kr* Proteinexpression im Blastoderm, dem für die Segmentierung entscheidenen Entwicklungsstadium, wurde studiert. Hierzu wurde mit Hilfe von Antikörperfärbungen das *Kr* Proteinmuster in Embryonen maternaler Segmentierungsmutanten wie auch in zygotischen Mutanten der Paarregel- und der "Gap" Klasse untersucht; die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die *Kr* Expression unterliegt einer Kontrolle durch die maternalen Segmentierungsgene. Sowohl anteriore (*bicoid*) wie posteriore und terminale "Organisatorgene" üben eine negative Kontrolle auf die *Kr* Expression aus. Diese Befunde legen folgende Modellvorstellung für die Regulation der *Kr* Expression nahe: *Kr* wird durch einen ubiquitären Transkriptionsfaktor aktiviert; aufgrund der repressiven Wirkung der anterioren, posterioren und terminalen "Organisatorgene" bleibt aber die *Kr* Expression auf die zentrale Region des Embryos beschränkt.

Ebenso wurde die Beteilung der benachbarten "Gap" Gene bei der Festlegung der Domänengrenzen der *Kr* Proteinexpression untersucht.

Die Paarregelgene kontrollieren die Expression von *Kr* Protein im Blastoderm nicht.

Somit konnte die Position von *Kr* in der Hierarchie der Segmentierungsgene, die durch Unterordnung unter die maternalen Gene und Überordnung über die Paarregelgene charakterisiert ist, bestätigt werden.

Durch die Analyse verschiedener maternaler Segmentierungs(doppel)-mutanten konnte ferner nachgewiesen werden, daß *Kr* per se innerhalb seiner eigenen Expressionsdomäne den Segmentierungsprozeß nicht zu instruieren vermag und daß es hierzu vermutlich der Mithilfe der benachbarten Gap Gene bedarf.

Nach dem Blastodermstadium ist *Kr* in einer Anzahl von Geweben transient exprimiert, wobei zumindest für die Malpighigefäße die funktionelle Bedeutung dieser Expression erwiesen ist.

Diese späte *Kr* Expression wird in den unterschiedlichen Geweben durch je verschiedene Sets von Genen kontrolliert. Für die Expression in Stomodäum und Malpighianlagen konnte gezeigt werden, daß *Kr* dort durch *fkh* - ein homöotisches Gen - direkt oder indirekt positiv kontrolliert wird. Für die späte Expression können sich also im Vergleich zum Segmentierungsprozeß die hierarchischen Verhältnisse umkehren.

Die Analyse von P-induzierten *Kr* Mutanten zeigte, daß die "upstream" Kontrollelemente für frühe und späte Transkription voneinander separiert sind.

Für späte Stadien der *Kr* Expression wurde eine Diskrepanz zwischen Transkript- und Proteinverteilung aufgewiesen, die auf eine posttranskriptionelle Regulation der *Kr* Proteinexpression hindeutet; die mögliche Rolle der *Kr* Intron RNA bei dieser Regulation wurde untersucht.

Literaturverzeichnis

Anderson, K.V. (1987):
Dorsal-ventral embryonic pattern genes of *Drosophila*
TIG 3, 91-97

Anderson, K.V. und Lengyel, J.A. (1979):
Rates of synthesis of major classes of RNA in *Drosophila* embryos
Dev Biol 70, 217-231

Akam, M. (1987):
The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo
Dev 101, 1-22

Briand, J. P., Müller, S., van Regenmortel, M.H.V. (1985):
Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods
J Immunol Meth 78, 59-69

Bull, A.L. (1966):
bicaudal, a genetic factor which affects the polarity of the embryo in *Drosophila melanogaster*
J Exp Zool 161, 221-242

Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V. (1985):
The embryonic development of *Drosophila melanogaster*
Springer, Berlin

Carroll, S.B. und Scott, M.P. (1985):
Localization of the *fushi tarazu* protein during Drosophila embryogenesis
Cell 43, 47-57

Chan, L.N., Gehring, W. (1971):
Determination of blastoderm cells in *Drosophila melanogaster*
PNAS 68, 2217-2222

Chow, L.T. und Broker, T.R. (1981):
Mapping RNA:DNA heteroduplexes by electron microscopy.
In Electron microscopy in Biology, Vol. 1, 139-188, Wiley&Sons, New York

Chowdhury, K., Deutsch, U., Gruss, P. (1987):
A multi-gene family encoding several "finger" structures is present and differentially active in mammalian genomes
Cell 48, 771-778

Davy, J., Dimmock, N.J., Colman, A. (1985):
Identification of the sequence responsible for the nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in Xenopus oocytes
Cell 40, 667-675

DiNardo, S., Kuner, J.M., Theis, J., O'Farrell, P.H. (1985):
Development of embryonic pattern in Drosophila melanogaster as revealed by accumulation of the nuclear *engrailed* protein
Cell 43, 59-69

Dingwall, C., Sharnick, S.V., Lashey, R.A. (1982):
A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus
Cell 30, 449-458

Dobberstein, B., Garoff, H., Warren, G., Robinson, P.J. (1979):
Cell free synthesis and membrane insertion of mouse H-2D^{d} histocompatibility antigen and $ß_2$-microglobulin
Cell 17: 759-769

Doyle, H.J., Harding, K., Hoey, T, Levine, M. (1986):
Transcripts encoded by a homeo box gene are restricted to dorsal tissues of *Drosophila* embryos
Nature 323, 77-79

Dreyer, C., Stick, R., Hausen, P. (1986):
Uptake of oocyte nuclear proteins by nuclei of *Xenopus* embryos
in: Nucleocytoplasmatic Transport, R. Peters, M.Trendelenburg (ed.), Springer, Berlin,143-157

Frasch, M. (1985):
Charakterisierung chromatinassoziierter Kernproteine von *Drosophila melanogaster* mit Hilfe monoklonaler Antikörper
Doktorarbeit, Tübingen

Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H., Levine, M. (1987):
Characterization and localization of the *even-skipped* protein of *Drosophila*
EMBO J 6, 749-759

Frohnhöfer, H.-G. und Nüsslein-Volhard, C. (1986):
Organization of anterior pattern in the *Drosophila* embryo by the maternal gene *bicoid*
Nature 324, 120-125

Frohnhöfer, H.-G. und Nüsslein-Volhard, C. (1987):
Maternal genes required for the anterior localization of *bicoid* activity in the embryo of *Drosophila*
Genes Dev (im Druck)

Frohnhöfer, H.-G. (1987):
Maternale Gene und die Anlage des anteroposterioren Musters in *Drosophila* Embryonen
Doktorarbeit, Tübingen

Gaul, U. (1985):
In vivo und in vitro Untersuchungen zur Auswanderung von Neuralleistenzellen
Diplomarbeit, Tübingen

Gaul, U. und Jäckle, H. (1987):
How to fill a gap in the *Drosophila* embryo
TIG 3, 127-131

Gaul, U. und Jäckle, H. (1987):
Pole region-dependent repression of the Drosophila gap gene *Krüppel* by maternal gene products
Cell 51 (im Druck)

Gaul, U., Seifert, E., Schuh, R., Jäckle, H. (1987):
Analysis of the *Krüppel* protein distribution during early Drosophila development reveals posttranscriptional regulation
Cell 50, 639-647

Gloor, H. (1954):
Phänotypen der Heterozygoten bei der unvollständig dominanten, homozygot lethalen Mutante *Kr*(=*Krüppel*) von *Drosophila melanogaster*
Arch Jul Klaus Stiftung 29, 277-287

Goldfarb, D.S., Gariepy, J., Schodnik, G., Kornberg, R.D. (1986):
Synthetic peptides as nuclear localization signals
Nature 322, 641-644

Hall, L.M.C. und Spierer, P. (1986):
The *Ace* locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5′ leader
EMBO J 5, 2949-2954

Hall, M.N., Hereford, L., Herskowitz, I. (1984):
Targeting of E.coli ß-galactosidase to the nucleus in yeast
Cell 36, 1057-1065

Hartshorne, T.A., Blumberg, H., Young, E.T. (1986):
Sequence homology of the yeast regulatory protein ADR1 with *Xenopus* transcription factor TFIIIA
Nature 320, 283-287

Hiromi, Y., Kuroiwa, A., Gehring, W.J. (1985):
Control elements of the Drosophila segmentation gene *fushi-tarazu*
Cell 43, 603-613

Honda, B.M. und Roeder, R.G. (1980):
Association of a 5S gene transcription factor with 5S RNA and altered levels of the factor during cell differentiation
Cell 22, 119-126

Howard, K., Ingham, P. (1986):
Regualtory interactions between the segmentation genes *ftz*, *h*, *en* in the *Drosophila* blastoderm
Cell 44, 949-957

Howard, K., Ingham, P., Martinez Arias, A.:
"in situ methods", Laboratory manual

Ingham, P.W., Ish-Horowicz, D., Howard, K.R. (1986):
Correlative changes in homeotic and segmentation gene expression in *Kr* mutant embryos of *Drosophila*
EMBO J 5, 1659-1665

Jäckle, H., Tautz, D., Schuh, R., Seifert, E., Lehmann, R. (1986):
Cross-regulatory interactions among the gap genes of *Drosophila*
Nature 324, 668-670

Jäckle, H., Rosenberg, U.B., Preiss, A., Seifert, E., Knipple, D.C., Kienlin, A., Lehmann, R. (1985):
Molecular analysis of *Krüppel*, a segmentation gene of *Drosophila melanogaster*
Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, Vol L, 465-473

Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., Kluding, H. (1984):
Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome
Roux's Arch Dev Biol 193, 283-295

Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., Smith, A.E. (1984):
A short amino acid sequence able to specify nuclear location
Cell 39, 449-509

Knipple, D., Seifert, E., Rosenberg, U.B., Preiss, A., Jäckle, H. (1985):
Spatial and temporal pattern of *Krüppel* gene expression in early *Drosophila* embryos
Nature 317, 40-44

Lanford, R.E. und Butel, J.S. (1984):
Construction and characterization of an SV 40 mutant defective in nuclear transport of T antigen
Cell 37, 801-813

Laemmli, U. K. (1970):
Cleavage of struktural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4
Nature 277, 680-685

Lawrence, P.A. und Johnston, P. (1984):
On the role of the *engrailed* gene in the internal organs of *Drosophila*
EMBO J 3, 2839-2844

Lehmann, R. (1985):
Regionsspezifische Segmentierungsmutanten bei *Drosophila melanogaster Meigen*
Doktorarbeit, Tübingen

Lehmann, R. und Nüsslein-Volhard, C. (1986):
Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of *oskar*, a maternal gene in Drosophila
Cell 47, 141-152

Lindsley, D.L. und Grell, E.H. (1968):
Genetic variations of *Drosophila melanogaster*
Carnegie Inst Wash Publ, No. 627

Lindsley, D.L. und Zimm, G. (1986):
The genome of *Drosophila melangaster.* Part 1: Genes A-K (and Deficiencies)
Dros Inf Serv 62, 1-227

Lohka, M. J., Masui, Y. (1983):
Formation in vitro of sperm nuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components
Science 220, 719-721

Lohs-Schardin, M., Cremer, C., Nüsslein-Volhard, C. (1979):
A fate map for the larval epidermis of *Drosophila melanogaster*: Localized cuticle defects following irradiation of the blastoderm with an ultraviolet laser microbeam
Dev Biol 73, 239-255

MacDonald, M. und Struhl, G. (1986):
A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying the body pattern
Nature 324, 537-545

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, K. (1982):
Molecular cloning, a laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

Meinhardt, H. (1986):
Hierarchical induction of cell states: a model for segmentation in *Drosophila*
J Cell Sci Suppl 4, 357-381

Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., Green, M.R. (1984):
Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter
Nucl Acids Res 12, 7035-7056

Miller, J., McLachlan, A.D., Klug, A. (1985):
Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes
EMBO J 4, 1609-1614

Mohler, J. und Wieschaus, E. (1986):
Dominant maternal-effect mutations of *Drosophila melanogaster* causing the production of double-abdomen embryos
Genetics 112, 803-822

Mueller, P.P., Hinnebusch, A.G. (1986):
Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4
Cell 45, 201-207

Müller-Holtkamp, F., Knipple, D. C., Seifert, E., Jäckle, H. (1985):
An early role of maternal mRNA in establishing the dorso-ventral pattern in *pelle* mutant *Drosophila* embryos
Dev Biol 110, 238-246

Nicolas, J.B., Dubois, P., Jacob, H., Gaillard, J., Jacob, F. (1975):
Teratocarcinome de la souris: differentiation en culture d´un linée de cellule primitives á potentialités multiples
Ann Microbiol (Inst. Pasteur) 126A, 3-22

Nüsslein-Volhard, C. (1977):
A rapid method for screening eggs from single *Drosophila* females
Dros Inf Serv. 52, 166

Nüsslein-Volhard, C. und Wieschaus, E. (1980):
Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*
Nature 287, 795-801

Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., Jürgens, G. (1982):
Segmentierung bei *Drosophila* - Eine genetische Analyse
Verh Dtsch Zool Ges 1982, 91-104

Nüsslein-Volhard, C., Frohnhöfer, H.-G., Lehmann, R. (zur Publikation eingereicht):
Determination of anteroposterior polarity in the *Drosophila* embryo

Palfreyman, J.F., Aitcheson, T.C., Taylor, P. (1984):
Guidelines for the production of polypeptide specific antisera using small synthetic oligopeptides as immunogens
J Immunol Meth 75, 383-393

Petschek, J., Perrimon, N., Mahowald, A.P. (1987):
Region specific effects in *l(1)giant* embryos of *Drosophila*
Dev Biol 119, 177-189

Preiss, A. (1985):
Molekulargenetische Analyse von Krüppel, ein Segmentierungsgen von *Drosophila melanogaster (Meigen)*
Doktorarbeit, Tübingen

Preiss, A., Rosenberg, U.B., Kienlin, A., Seifert, E., Jäckle, H. (1985):
Molecular genetics of *Krüppel*, a gene required for segmentation of the *Drosophila* embryo
Nature 313, 27-33

Richardson, W.D., Roberts, B.L., Smith, A.E. (1986):
Nuclear location signals in polyoma virus large T
Cell 44, 77-85

Rio, D.C., Laski, F.A., Rubin, G.M. (1986):
Identification and immunochemical analysis of biologically active Drosophila P element transposase
Cell 44, 21-32

Roberts, B.L., Richardson, W.D., Smith, A.E. (1987):
The effect of protein context on nuclear location signal function
Cell 50, 465-475

Rosenberg, U.B., Preiss, A., Seifert, E., Jäckle, H., Knipple, D.C. (1985):
Production of phenocopies by *Krüppel* antisense RNA injection into *Drosophila* embryos
Nature 313, 703-706

Rosenberg, U.B., Schröder, C., Preiss, A., Kienlin, A., Cote, S., Riede, I., Jäckle, H. (1986):
Structural homology of the product of the *Drosophila Krüppel* gene with *Xenopus* transcription factor IIIA
Nature 319, 336-339

Rüther, U. und Müller-Hill, B. (1983):
Easy identification of cDNA clones
EMBO J 2, 1791-1794

Scott, M.P. und O'Farrell, P.H. (1986):
Spatial programming of gene expression in early *Drosophila* embryogenesis
Ann Rev Cell Biol 2, 49-80

Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., Coté, S., Preiss, A., Maier, D., Seifert, E., Nauber, U., Schröder, C., Kemler, R., Jäckle, H. (1986):
A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by *Krüppel*, a Drosophila segmentation gene
Cell 47, 1025-1032

Schüpbach, T. und Wieschaus, E. (1986):
Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo
Roux's Arch Dev Biol 195, 302-317

Shapira, H., Dibson, M., Muller, G., Amen, R. (1984):
Immunity and protection against influenza virus by synthetic peptide corresponding to antigenic sites of hemagglutinin
PNAS 81, 2461-2465

Simcox, A.A. und Mahowald, A.P. (1983):
When does determination occur in *Drosophila* embryos
Dev Biol 97, 212-221

Steller, H. und Pirrotta, V. (1984):
Regulated expression of genes injected into early embryos
EMBO J 3, 165-173

Stephenson, E.C. und Mahowald, T. (in Vorbereitung):
Isolation of *Drosophila* clones encoding maternally-restricted RNAs

Strecker, T., Kongsuwan, K., Lengyel, J., Merriam, J. (1986):
The zygotic mutant *tailless* affects the anterior and posterior ectodermal regions of the *Drosophila* embryo
Dev Biol 113, 64-76

Tautz, D., Lehmann, R., Schnürch, H., Schuh, R., Seifert, E., Kienlin, A., Jones, K., Jäckle, H. (1987):
Finger protein of novel structure encoded by *hunchback*, a second member of the gap class of *Drosophila* segmentation genes
Nature 327, 383-389

Tearle, R. und Nüsslein-Volhard, C. (1987):
Tübingen mutants and stocklist
Dros Inf Serv (im Druck)

Technau, G.M. und Campos-Ortega, J.A. (1985):
Fate mapping in wildtype *Drosophila melanogaster* II. Injections of horseradish peroxidase in cells of the early gastrula stage
Roux's Arch Dev Biol 194, 196-212

Thomas, P.S. (1980):
Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose
PNAS 77, 5201-5205

Turner, F.R. und Mahowald, A.P. (1976):
Scanning electron microscopy of *Drosophila* embryogenesis: I. The structure of the egg envelopes and the formation of the cellular blastoderm
Dev Biol 50, 95-108

Underwood, E.M., Turner, F.R., Mahowald, A.P. (1980):
Analysis of cell movement and fate mapping during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*
Dev Biol 74, 286-301

Vestweber, D. (1985):
Das Zelladhäsionsmolekül Uvomorulin, strukturelle und funktionelle Analyse
Doktorarbeit, Tübingen

Vincent, A. (1986):
TFIIIA and homologous genes. The "finger" proteins
Nucl Acids Res 14, 4385-4391

Van der Meer, J. (1977):
Optical clean and permanent whole mount preparation for phase contrast microscopy of cuticular structures of insect larva
Dros Inf Serv 52, 160

White, R. und Wilcox, M. (1984):
Protein products of the bithorax complex in Drosophila
Cell 39, 163-171

White, R. und Lehmann, R. (1986):
A gap gene, *hunchback*, regulates the spatial expression of *Ultrabithorax*
Cell 47, 311-321

Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., Kluding, H. (1984):
Krüppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation
Dev Biol 104, 172-186

Wright, T.R.F., Bewley, G.C., Sherald, A.F. (1976):
The genetics of dopa decarboxylase in *Drosophila melanogaster*. Isolation and characterization of dopa decarboxylase mutants and their relationship to the -methyldopa hypersensitive mutants
Genetics 84, 287-310

Lebenslauf

Ulrike Gaul-Unnerstall geb. Gaul

5.8.1960	Geburt in Möckmühl/Baden-Württemberg Eltern: Otto und Irene Gaul
1967-69	Grundschule in Roigheim
1969-78	Gymnasium Möckmühl
1978	Abitur am Gymnasium Möckmühl
1978-1985	Stipendiatin der Studienstiftung des dt. Volkes
1978-85	Studium der Biochemie und der Physik (Studienbeginn 1980) an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
1981	Vordiplom in Biochemie
1983	Vordiplom in Physik, mündliche Diplom-Hauptprüfung in Biochemie
1984	Anfertigung der Diplomarbeit in Biochemie unter Anleitung von Prof. Dr. U. Schwarz am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen; Titel der Arbeit: In vivo und in vitro Untersuchungen zur Auswanderung von Neuralleistenzellen
1985	Diplom der Biochemie der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen; mündliche Diplom-Hauptprüfung in Physik
1986-1987	Stipendiatin der Studienstiftung des dt. Volkes (Promotionsförderung)
1985-87	Anfertigung der Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. H. Jäckle am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen; Titel der Arbeit: Untersuchungen zur Funktion und Regulation von *Krüppel*, einem Segmentierungsgen von *Drosophila melanogaster* (*Meigen*)

Meine akademischen Lehrer waren:

Bardele, Tübingen
Braitenberg, Tübingen
Braun, Tübingen
Creutzfeldt, Göttingen
Fäßler, Tübingen
Fischer, Tübingen
Güttinger, Tübingen
Hagenmaier, Tübingen
Herrmann, Tübingen
Jäckle, Tübingen
Jürgens, Tübingen
Lindner, Tübingen
Mack, Tübingen
Mecke, Tübingen
Meinhardt, Tübingen
Metzner, Tübingen
Nakel, Tübingen
Newgreen, Tübingen
Nüsslein-Volhard, Tübingen
Oberhammer, Tübingen
Oelkrug, Tübingen
Pfister, Tübingen
Probst, Tübingen
Rabin, London
Schnitzler, Tübingen
Schwarz, Tübingen
Seelig, Tübingen
Seyffert, Tübingen
Strähle, Tübingen
Szalay, Szeged
Zimmermann, Göttingen

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45